

KALORISCHE MESSUNGEN
DER DENATURIERUNGSENTHALPIE VON
HUMANHÄMOGLOBIN
IM OXY- UND DEOXYZUSTAND

von

KLAUS SCHMID

aus

Nürnberg

*Diss. Erlangen
1984*

1084 W 102





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546206_0109

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

KALORISCHE MESSUNGEN
DER DENATURIERUNGSENTHALPIE VON
HUMANHÄMOGLOBIN
IM OXY- UND DEOXYZUSTAND

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

KLAUS SCHMID

aus

Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf

Referent: Prof. Dr.Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 1984

1.	Einleitung	1
2.	Die Familie	2
3.	Die Eltern	3
4.	Die Geschwister	4
5.	Die Ehe	5
6.	Die Kinder	6
7.	Die Jugend	7
8.	Die Berufswahl	8
9.	Die Ausbildung	9
10.	Die Arbeit	10
11.	Die Freizeit	11
12.	Die Gesundheit	12
13.	Die Religion	13
14.	Die Politik	14
15.	Die Kultur	15
16.	Die Wissenschaft	16
17.	Die Kunst	17
18.	Die Literatur	18
19.	Die Musik	19
20.	Die Sportarten	20
21.	Die Reisen	21
22.	Die Auslandsaufenthalte	22
23.	Die Emigration	23
24.	Die Nachkriegszeit	24
25.	Die Gegenwart	25
26.	Die Zukunft	26

Meiner Familie

1.	Meine Eltern	1
2.	Meine Geschwister	2
3.	Meine Ehe	3
4.	Meine Kinder	4
5.	Meine Jugend	5
6.	Meine Berufswahl	6
7.	Meine Ausbildung	7
8.	Meine Arbeit	8
9.	Meine Freizeit	9
10.	Meine Gesundheit	10
11.	Meine Religion	11
12.	Meine Politik	12
13.	Meine Kultur	13
14.	Meine Wissenschaft	14
15.	Meine Kunst	15
16.	Meine Literatur	16
17.	Meine Musik	17
18.	Meine Sportarten	18
19.	Meine Reisen	19
20.	Meine Auslandsaufenthalte	20
21.	Meine Emigration	21
22.	Meine Nachkriegszeit	22
23.	Meine Gegenwart	23
24.	Meine Zukunft	24

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Methodik	3
2.1	Die kalorimetrische Untersuchung	3
2.1.1	Die Theorie der registrierenden Differential-Kalorimetrie	3
2.1.2	Anwendung des DSC-2 für Messungen im Temperaturbereich von 280 Kelvin bis 380 Kelvin	6
2.1.3	Einstellung der Basislinie	8
2.1.4	Kalibrierung der Temperatur	8
2.1.5	Enthalpiekalibrierung mit Indium	9
2.1.6	Darstellung der Ergebnisse	13
2.2	Die menschlichen Erythrozyten	13
2.2.1	Der Aufbau des menschlichen Erythrozyten	13
2.2.2	Gewinnung einer Erythrozyten- suspension	14
2.2.3	Gewinnung eines Erythrozyten- hämolysats	15
2.3	Das menschliche Hämoglobin	16
2.3.1	Struktur und Funktion des menschlichen Hämoglobins	16
2.3.2	Die Herstellung einer Hämoglobin- Stammlösung	18
2.3.3	Kontrolle der Hämoglobin-Stammlösung nach der Lagerung	21

2.3.4	Herstellung einer Hämoglobinlösung mit Salzzugabe	24
2.4	Behandlung der Lösungen mit CO ₂ -Gas	25
2.5	Spektrophotometrische Messungen	26
3	Meßergebnisse	31
3.1	Erläuterungen zur Darstellung der Meßergebnisse	31
3.2	Ergebnisse der Messungen von Erythro- zytensuspensionen vor und nach Lagerung unter Luftabschluß	34
3.3	Ergebnisse der Messungen von Erythro- zytensuspensionen mit und ohne Behandlung mit CO ₂ -Gas	41
3.4	Ergebnisse der Messungen von Erythro- zytenhämolysaten mit und ohne Behandlung mit CO ₂ -Gas	46
3.5	Ergebnisse der Messungen von Hämoglobinlösungen mit und ohne Behandlung mit CO ₂ -Gas	51
3.6	Ergebnisse der Messungen von Hämoglobin in Kochsalzlösung mit und ohne Behandlung mit CO ₂ -Gas	56
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	61
4	Diskussion	62

5	Zusammenfassung	67
6	Anhang	68
6.1	Erklärungsmöglichkeiten für die gemessene Differenz der Denaturierungs- enthalpien von Oxy-Hämoglobin und Deoxy-Hämoglobin	68
6.2	Berechnung der spezifischen Denaturierungsenthalpie für Hämoglobin im Oxy- und Deoxy-Zustand	72
7	Literaturverzeichnis	76

1 Einleitung und Problemstellung

Die meisten Zellen des menschlichen Körpers besitzen eine besondere Adaptation an ihre Aufgaben, die sie in Geweben und Organen zu erfüllen haben. Besondere Aufmerksamkeit wurde den roten Blutzellen gewidmet, deren spezielle Anpassung an ihre Funktion als Sauerstoffüberträger vielen Untersuchungen unterzogen worden ist.

Thermodynamische Methoden erscheinen geeignet, Lebensäußerungen von Zellen quantitativ und qualitativ zu erfassen. So veröffentlichte J.B. BATEMAN bereits 1931 einen Artikel über die Wärmeproduktion von Blut [4] .

Mit der Entwicklung verbesserter Verfahren zur Messung eines Wärmeflusses konnten immer genauere Untersuchungen an Zellen vorgenommen werden.

Dabei wurden Ergebnisse gewonnen, die von klinischer Bedeutung in der Medizin sind.

So konnten M. MONTI und I. WADSÖ, sowie K.LEVIN Unterschiede in der Wärmeproduktion von Blutzellen finden, zwischen solchen von anämischen und nicht anämischen Patienten und hyperthyroiden Patienten vor und nach der Behandlung [23,24,20,21] .

Durch kalorische Untersuchungen konnte T.KRAKAUER eine antigene Stimulation von Lymphozyten nachweisen [18] .

Zum besseren Verständnis des Aufbaus von Zellen und Zytoplasma wurden am Institut für Radiologie der Universität Erlangen-Nürnberg kalorimetrische Untersuchungen an Zell-Modellen und biologischen Zellen vorgenommen [13,25,26] .

Bei diesen und ähnlichen Untersuchungen fiel auf, daß der Denaturierungsspeak von Hämoglobin bei zwei verschiedenen Temperaturen auftrat, die sich um etwa zehn Grad unterschieden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Erscheinung qualitativ zu verifizieren und den Ursachen auf die Spur zu kommen.

Zu diesem Zweck wurden die Beobachtungen zunächst an lebenden menschlichen Erythrozyten nachvollzogen und dem Oxy- und Deoxy-Zustand des Hämoglobins zugeordnet. Danach wurden die Untersuchungen auf Erythrozytenhämolysate und Hämoglobininlösungen, die aus menschlichem Vollblut präpariert waren, ausgedehnt.

Die Denaturierungsenthalpie sowie die Temperatur wurden bei den Proben mit der zur Verfügung stehenden Genauigkeit bestimmt.

Als Methode diente die registrierende Differential-Kalorimetrie.

2 Methodik

2.1 Die kalorimetrischen Untersuchungen

2.1.1 Die Theorie der registrierenden Differential-Kalorimetrie

Zur Messung der Denaturierungsenthalpie der Proben wurden diese in einem registrierenden Differential-Kalorimeter nach einem vorgegebenen Temperaturprogramm erwärmt.

Wenn ein Material seinen physikalisch-chemischen Zustand ändert, oder chemisch reagiert, so wird Wärme dabei aufgenommen oder abgegeben. Das registrierende Differential-Kalorimeter bestimmt die Wärmemenge dieser Prozesse, indem es die Temperaturdifferenz zwischen der Probe und einem indifferenten Vergleichsstoff beseitigt und die dazu nötige Wärmemenge mißt. Die beiden Näpfchen, die die Probe und die Vergleichssubstanz aufnehmen, enthalten jeweils einen eigenen Heizer und Temperaturfühler. Falls eine Temperaturdifferenz meßbar wird, wegen exothermer oder endothermer Reaktion der Probe, so wird diese durch eine Änderung der Heizleistung sofort ausgeglichen.

Ein der Differenz der Heizleistung zwischen Probe und Vergleichssubstanz proportionales Signal wird dem Schreiber zugeleitet. Auf der Abszisse des Schreiberpapiers wird die Temperatur fortlaufend registriert, so daß die Übergangstemperatur direkt abgelesen werden kann.

Die Peakfläche gibt den gesamten Energietransport zur und von der Probe an.

Die Abbildung 2.1 zeigt den Aufbau des Kalorimeters an Hand eines Blockschaltbildes.

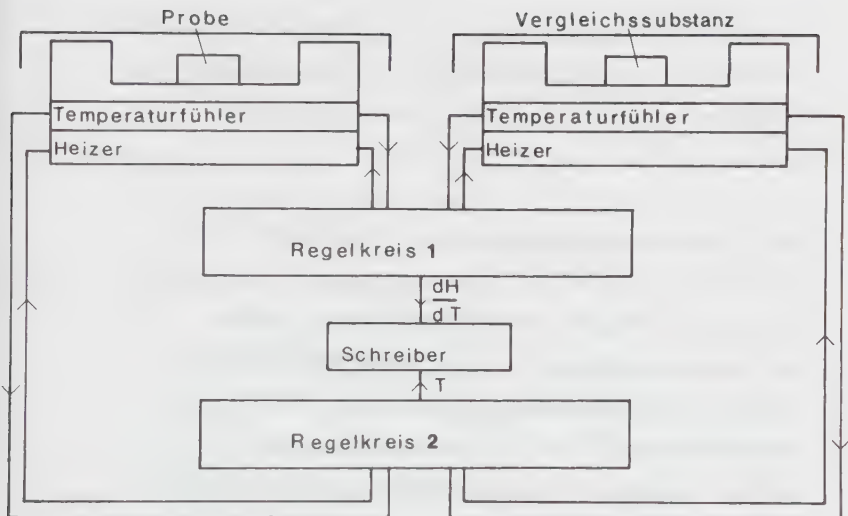


Abbildung 2.1 : Blockschaltbild des verwendeten registrierenden Differentialkalorimeters.

Der Regelkries 1 beseitigt die zwischen Probe und Vergleichssubstanz auftretenden Temperaturdifferenzen. Der Regelkreis 2 dient zur Steuerung der Programmtemperatur.

2.1.2 Anwendung des DSC-2 für Messungen im
Temperaturbereich von 280 Kelvin bis
380 Kelvin

In dieser Arbeit wurde ein registrierendes Differential-Kalorimeter vom Typ DSC-2 der Firma PERKIN-ELMER (Bodenseewerke PERKIN-ELMER, Überlingen) verwendet.

Um in dem Temperaturbereich von 280 Kelvin bis 380 Kelvin arbeiten zu können, mußte der Aluminiumblock des Meßkopfes entsprechend gekühlt werden. Als Badflüssigkeit, die den Aluminiumblock durchspülte, wurde Methylalkohol verwendet. Ein ULTRAKRYOMAT K 120 W der Meßgerätewerke LAUDA pumpte die auf 240 Kelvin gekühlte Badflüssigkeit durch den Aluminiumblock.

Als Schreiber wurde ein Potentiometerschreiber linear x_1 und x_2 RE 571 der Firma METRAWATT AG verwendet, der gleichzeitig die jeweilige Programtemperatur mitregistrierte.

Die Bestimmung der Probenmassen erfolgte mit einer Elektro-Cahn-Waage (CAHN-G-2-Elektrobalance VENTRON INSTRUMENTS CORPORATION, Paramount, California, USA). Diese Waage hat eine

Empfindlichkeit von 0,1 mg Vollausschlag und eine Ablesegenauigkeit von 0,01 % vom Vollausschlag. Die Probenmassen betrugen einige Milligramm.

Jede Probe wurde in eine Aluminiumkapsel gasdicht eingeschlossen. Als Vergleichssubstanz diente eine leere Aluminiumkapsel. Die Massen dieser Aluminiumkapseln betrugen im Mittel 26,90 mg. Sie wurden für jede Probe einzeln bestimmt, und nicht als konstanter Leerwert abgezogen, da größere Abweichungen vorkamen.

Der genaue Wassergehalt jeder einzelnen Probe wurde durch die Bestimmung der Trockenmasse ermittelt. Nach der Messung im Kalorimeter wurden die Aluminiumkapseln, die die Proben enthielten, aufgestochen, bei einer Temperatur von 380 Kelvin bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann erneut gewogen.

Alle Messungen mit dem Kalorimeter wurden in einem Temperaturbereich von 280 Kelvin bis 380 Kelvin durchgeführt. Wie B. HÄGERDAL [14] zeigte, hängen die Denaturierungstemperaturen und -Enthalpien von Myoglobin von der jeweils verwendeten Heizrate ab. Für die hier beschriebenen Versuche mit Hämoglobinlösungen und Erythrozyten betrug die Heizrate stets zehn Grad pro Minute.

Die Empfindlichkeit war am Kalorimeter auf $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec.}^{-1}$ eingestellt (das entspricht $2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec.}^{-1}$). Der Schreibervorschub betrug 30 mm pro Minute.

Vor Beginn der Untersuchungen wurde das Gerät kalibriert. Die Kalibrierung ist in den Abschnitten 2.1.3 bis 2.1.5 beschrieben.

2.1.3 Einstellung der Basislinie

Vor Beginn der Kalibrierung sollte eine Optimierung der Basisliniengeradheit erfolgen. Bei der gewählten Empfindlichkeit, bei der auch die späteren Untersuchungen durchgeführt werden sollten, erwies es sich als schwer eine optimal reproduzierbare Basislinie einzustellen. So waren stets geringfügige Nachkorrekturen notwendig. Auch zeigten sich in der Basislinie vereinzelt Regelschwankungen.

2.1.4 Kalibrierung der Temperatur

Zur Kalibrierung werden oft hochreine Metalle benutzt. Der Schmelzpunkt von Indium liegt mit 429,8 Kelvin knapp außerhalb des Meßbereichs für diese Untersuchung. So wurden zusätzlich die

Schmelzpunkte der beiden organischen Substanzen n-Oktadecan (reinst, Bezugssubstanz zur Gaschromatographie, MERCK) und Cyclohexan (reinst, Bezugssubstanz zur Gaschromatographie, MERCK) zur Temperaturkalibrierung verwendet. Nach Beendigung aller Versuche wurde die Temperaturkalibrierung erneut kontrolliert. Es ergaben sich die in Tabelle 2.1 aufgeführten Werte.

Eichsubstanz	gemessener Wert	Literaturwert	Abweichung
Cyclohexan	279,4 K	279,7 K	- 0,3 Grad
n-Oktadecan	301,2 K	301,4 K	- 0,2 Grad
Indium	430,0 K	429,8 K	+ 0,2 Grad

Tabelle 2.1 : Kontrolle der Temperaturkalibrierung nach Beendigung der Versuche.

2.1.5 Enthalpiekalibrierung mit Indium

Zur Kalibrierung wurde hochreines Indium benutzt, dessen Schmelzenthalpie genau bekannt ist. Sie beträgt 28,4 Joule je Gramm (6,78 Kalorien je Gramm). Die Temperatur bei Beginn des Peaks wird als T_a bezeichnet, die Temperatur bei Peakende als T_e . Die beiden Punkte $c_p(T_a)$ und $c_p(T_e)$ wurden in den aufgezeichneten Meßkurven durch eine Gerade verbunden. Diese Gerade wurde als Bezugslinie bezeichnet.

Sie begrenzt die Peakfläche (siehe Abbildung 2.2). Die Integration der Kurven wurde mit Hilfe einer Rechenanlage ¹ durchgeführt. Zur Messung der gesamten Enthalpie bei einer Zustandsänderung muß der Peak der Wärmekapazität C_p über der Temperatur integriert werden. Von diesem Wert muß nun noch das Trapez zwischen Bezugslinie und Basislinie abgezogen werden, um die Enthalpie zu erhalten, die der Zustandsänderung zugeordnet wird. Die Peakfläche, die dieser Enthalpie entspricht ist in Abbildung 2.2 schraffiert gezeichnet. Es ergibt sich daher die Gleichung 1.

$$(1) \quad \Delta H \simeq \int_{T_a}^{T_e} C_p dT - (T_e - T_a) \cdot \frac{C_p(T_a) + C_p(T_e)}{2}$$

Vorlage für die Integration war die analog aufgezeichnete Meßkurve C_p über T . Mit Hilfe eines Ultraschallgriffels konnten die Koordinaten beliebig vieler Kurvenpunkte am Rechner digitalisiert werden. Die Berechnung der Peakfläche nach Abzug der Bezugslinie erfolgte in dem selben Arbeitsgang.

1) Der Strahlentherapeutischen Klinik der Universität
Erlangen danke ich für die Benutzung ihrer
Rechenanlage.

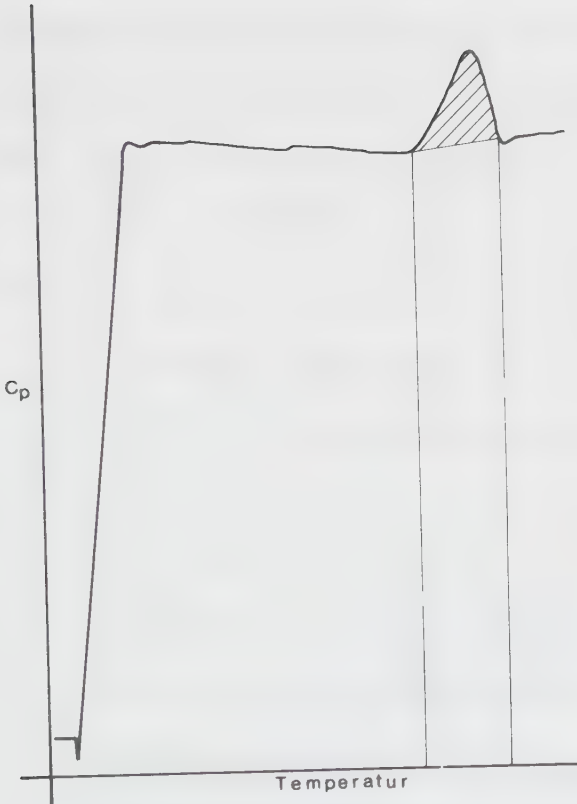


Abbildung 2.2 : Darstellung eines Denaturierungsthermogramms.
Spezifische Wärmekapazität über der Temperatur
in willkürlichen Einheiten.

Beim wiederholten Abgreifen derselben Kurven ergab sich ein Fehler, der unter 1% lag. Die berechnete Peakfläche A ist dabei direkt proportional der spezifischen Enthalpieänderung Δh , der Probenmasse m, der Empfindlichkeit des Kalorimeterausgangs $\mathcal{E}_K$, der Empfindlichkeit des Schreibers $\mathcal{E}_S$, und der Schreibervorschubgeschwindigkeit s.

Es ergibt sich daher Gleichung 2.

$$(2) \quad A = \Delta h \cdot m \cdot s \cdot \mathcal{E}_S \cdot \mathcal{E}_K \cdot K$$

Die Bestimmung der dimensionslosen Proportionalitätskonstanten K erfolgt mittels der Bestimmung des Indiumschmelzpeaks. Dazu wurde Gleichung 3 verwendet.

$$(3) \quad K = \frac{A_{\text{In}}}{\Delta h_{\text{In}} \cdot m_{\text{In}} \cdot s \cdot \mathcal{E}_S \cdot \mathcal{E}_K}$$

mit

Δh_{In} = spezifische Schmelzenthalpie von Indium

m_{In} = Masse der Indiumprobe

A_{In} = Größe der Peakfläche des Indiumpeaks

Mit bekanntem K kann nun jede spezifische Übergangsenthalpie Δh bestimmt werden. Aus der Umformung von Gleichung 2 ergibt sich Gleichung 4.

$$(4) \quad \Delta h = \frac{A}{m \cdot s \cdot \mathcal{E}_S \cdot \mathcal{E}_K \cdot K}$$

Bei der mit Indium mehrfach durchgeführten Kalibrierung ergab sich für die dimensionslose Proportionalitätskonstante K ein Wert von 1,06.

2.1.6 Darstellung der Ergebnisse

Entsprechend der Gepflogenheiten in der angewandten Kalorimetrie wurden endotherme Übergänge als Auslenkung der Basislinie nach oben, exotherme Übergänge entsprechend umgekehrt geschrieben. Temperaturangaben werden im folgenden in Grad Celsius gemacht, da dies für biologische Systeme allgemein üblich ist.

2.2 Die menschlichen Erythrozyten

2.2.1 Der Aufbau der menschlichen Erythrozyten

Der Volumenanteil der Zellen am Blut (Hämatokritwert) beträgt beim erwachsenen Menschen etwa 45%. Diesen Anteil machen zu mehr als 99% die Erythrozyten aus, den Rest die Leukozyten (0,3%) und die Blutplättchen (0,5%). Die Erythrozytenmasse teilt sich nach Angaben in der Literatur [31,34] . folgendermaßen auf: 61,6% Wasser, 36,8% Proteine - davon sind etwa 90% Hämoglobin - , 0,1% Ribonukleinsäure, 0,6% Lipide, 0,2% andere organische Substanzen und 0,78% Salze. So stellen in der Zelle Wasser und Protein den größten Anteil am Zytoplasma dar, beim Erythrozyten etwa 90% .

2.2.2 Gewinnung einer Erythrozytensuspension

Als Ausgangssubstanz diente stets frisch entnommenes menschliches Blut (Citratblut) eines gesunden Blutspenders der Blutbank der Universität Erlangen². Zur Gewinnung einer Erythrozytensuspension wurde das Citratblut mit einer Zentrifuge der Firma CHRIST bei 5.000 Umdrehungen pro Minute 20 Minuten lang zentrifugiert. Das Überstehende Plasma und die gelblich-weiße Leukozytenschicht wurden mit Hilfe einer Pipette und einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das erhaltene Erythrozytensediment war tiefrot und zähflüssig. Es wurde zur kalorimetrischen Messung verwandt.

In Vorversuchen wurden Messungen durchgeführt, bei denen die Erythrozyten mehrmals, teils mit physiologischer Kochsalzlösung, teils mit Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer gewaschen wurden. Da dadurch keine Verbesserung der Meßergebnisse eintrat, konnte zu Gunsten einer schnelleren Verarbeitung des frisch entnommenen Blutes darauf verzichtet werden. Beim Zentrifugieren von Erythrozyten tritt eine Verteilung der Zellen entsprechend ihres Alters auf, so daß beim wiederholten Abzentrifugieren stets die jungen Zellen mit entfernt würden [7,32].

2) Der Blutbank der Universität Erlangen-Nürnberg danke ich für die freundliche Unterstützung.

2.2.3 Gewinnung eines Erythrozytenhämolysates

Zur Herstellung eines Erythrozytenhämolysates wurden etwa 4 ml der Erythrozytensuspension mit 4 ml destillierten Wassers verdünnt und mehrere Minuten lang gut durchmischt. Danach wurde erneut zentrifugiert und so nachgewiesen, daß Hämolyse eingetreten war. Das Erythrozytenhämolysat wurde nochmals gut durchmischt und zur kalorimetrischen Messung verwendet.

2.3 Das menschliche Hämoglobin

2.3.1 Struktur und Funktion des menschlichen Hämoglobins

Menschliches Hämoglobin ist ein Molekül mit einem Molekulargewicht von etwa 67.000. Es besitzt eine charakteristische Quartärstruktur. Vier Peptidketten (2α und 2β -Ketten), die je ein Häm als prosthetische Gruppe und ein Molekulargewicht von 17.000 besitzen, lagern sich zusammen zu einer molekularen Funktionseinheit. Eine α -Kette enthält 141 Aminosäuren, eine β -Kette 146 Aminosäuren. Die Informationen über die Aminosäuresequenz stammen von G. BRAUNITZER et al. [8] und SCHROEDER et al. [33] .

Das Hämoglobinmolekül vermag je Hämanteil ein Molekül Sauerstoff zu binden und geht dabei in Oxy-Hämoglobin über.

Hämoglobin war das erste oligomere Protein, für das die komplette Tertiär- und Quartärstruktur bekannt geworden ist. Dies war ein Erfolg von M.F. PERUTZ und Mitarbeitern [28] . Das Molekül besitzt in seiner sauerstoffhaltigen Form eine kompakte, kugelige Struktur mit den Dimensionen $6,4 \text{ nm} \times 5,5 \text{ nm} \times 5,0 \text{ nm}$. Die Röntgenanalyse von Deoxy-Hämoglobin zeigt, daß die

Tertiärstruktur der vier Untereinheiten identisch mit der im Oxy- Hämoglobin ist. In der Quartärstruktur gibt es allerdings signifikante Unterschiede. [29].

Aufgabe des Hämoglobins ist es als Sauerstoffüberträger in den Erythrozyten den Sauerstoff auf seinem Weg von der sauerstoffreichen Lunge in das sauerstoffarme periphere Gewebe zu binden. In seiner Funktion als Sauerstoffträger pendelt das Hämoglobin zwischen 65% und 96% Sättigung mit Sauerstoff. Die Auftragung der Sättigung des Hämoglobins gegen den Sauerstoffpartialdruck ist sigmoid. Diese sigmoide Kurve entsteht infolge der Kooperativität der vier Untereinheiten des Hämoglobinmoleküls. In den Erythrozyten wird diese Bindungskurve durch den allosterischen Effektor 2,3 Bisphosphoglycerat und durch eine Verschiebung des pH-Wertes zur saueren Seite in Richtung eines größeren Sauerstoffpartialdrucks verschoben. Die Wirkung des pH-Wertes auf das Sauerstoff-Hämoglobin-Gleichgewicht wird Bohr-Effekt genannt [17,19] .

2.3.2 Die Herstellung einer Hämoglobin-Stammlösung

Die Hämoglobin-Stammlösung wurde aus zwei Blutkonserven der Blutbank der Universität Erlangen hergestellt. Es handelte sich um drei Tage alte Blutkonserven der Blutgruppe O RH positiv.

500 ml Blut enthalten 75 ml ACD-Adenin-Stabilisator.

1000 ml Stabilisator enthalten:

Citronensäure · H ₂ O	8,00 g
Natriumcitrat · 2 H ₂ O	22,00 g
Glucose-Monohydrat	24,50 g
Adenin	0,56 g
Aqua pro inject.	ad 1000 ml

Die Methode zur Herstellung einer Hämoglobin-Stammlösung stützt sich auf Arbeiten von

D.L. DRABKIN [10], S.A. HINSON [15] und R.L. BERGER [6]

und wurde im Rahmen von Doktorarbeiten am Institut für Radiologie der Universität Erlangen-Nürnberg von G. MENGES [22] und N. TRETTNER [35] weiterentwickelt.

Zuerst wurde das Plasma und auch teilweise die anderen Bestandteile des Blutes, wie Leukozyten, abzentrifugiert. Die Erythrozytensuspension wurde

nun vier Waschvorgängen unterzogen, einmal mit 0,9%-iger und dreimal mit 1,2%-iger Kochsalzlösung. Nach der letzten Wäsche wurden die Erythrozyten mit einer Ultrazentrifuge dicht gepackt.

Zur Hämolyse wurden die dicht gepackten Erythrozyten mit demineralisiertem Wasser und Toluol im Volumenverhältnis 1 : 1,2 : 0,4 gemischt und 6-8 Stunden bei 4 Grad Celsius geführt. Durch den Zusatz von Toluol wurde zusätzlich ein Wachstum von Bakterien in der Hämoglobininlösung verhindert. Das Toluol bewirkt keine nachweisbaren Änderungen am Hämoglobinemolekül. Nach J.A. HINSON [15] wirkt sich die Gegenwart von Toluol sogar günstig auf die Hämoglobinkristallbildung aus. Durch anschließendes Zentrifugieren und Ultrazentrifugieren konnte das Toluol und der überwiegende Teil des Erythrozytenstromas entfernt werden.

Die so erhaltene Hämoglobininlösung wurde zweimal durch einen Mischbett-Ionenaustauscher geschickt. Die Aufkonzentration der Hämoglobininlösung erfolgte durch Ultrafiltration. Das hierzu verwendete Gerät stammt von der Firma SATORIUS-MEMBRANFILTER GmbH, Göttingen. Das Ultrafiltrationsgerät bestand aus

fünf übereinanderliegenden Platten aus Polycarbonat (Makrolon der Farbenfabrik BAYER) , zwischen denen Ultrafiltrationsmembranen aus Cellulosenitrat mit einer gesamten Filtrationsfläche von 750 cm^2 lagen (Typ SM 12136) mit einer Durchlässigkeit von Substanzen bis zu einem Molekulargewicht von 10.000. Die Aufkonzentration dauerte etwa 12-15 Stunden und wurde bei 4 Grad Celsius durchgeführt.

Die Hämoglobinkonzentration der nun erhaltenen Stammlösung wurde mit Hilfe der Bestimmung der Trockenmasse ermittelt. Die Genauigkeit dieser Bestimmung betrug $\pm 0,1\%$. Der Massenanteil des Hämoglobins betrug in der Stammlösung 26,5%.

2.3.3 Kontrolle der Hämoglobin-Stammlösung nach der Lagerung

Die Hämoglobin-Stammlösung wurde, nachdem alle Versuche durchgeführt waren, auf Veränderungen am Hämoglobinmolekül untersucht. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war die Hämoglobin-Stammlösung über 5 Monate bei -34°C gelagert gewesen. Als Untersuchungsmethode diente die Gelchromatographie und die Extinktionsmessung.

Die Gelchromatographie wurde mit Hilfe einer etwa zwei Meter langen, mit SEPHADEX-G-75 gefüllten Säule, die bei 4°C in einem Kühlraum stand, durchgeführt. Die Säule wurde mit einem 0,1 molalen Phosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ p.A. MERCK und $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.A. MERCK), der auf $\text{pH} = 7,4$ eingestellt war und vorher sterilisiert wurde, drei Tage lang äquilibriert. Im Eluat war kein Wachstum von Mikroorganismen nachweisbar.

Bei der Chromatographie wurden 6 ml einer Hämoglobinlösung mit 0,6% Proteinanteil aufgetragen. Die Elutionsflüssigkeit wurde mit Hilfe eines Fraktionsammlers (LKB, Multirac 2111) zu je 3 ml aufgefangen. Die Auswertung erfolgte mit dem Spektralphotometer PM Q II der Firma

CARL ZEISS, Oberkochen/Württemberg bei 280 nm. Es ergab sich, daß im Chromatogramm nur ein einziger steiler und annähernd symmetrischer Peak erschien. Aus der Lage des Peaks konnte auf ein Molekulargewicht der betreffenden Fraktion von 67 000 geschlossen werden (siehe Abbildung 2.3).

Daraus darf geschlossen werden, daß während der Lagerung keine ausgeprägte Denaturierung, Dimerisierung, Aggregation oder Molekülbrüche am Hämoglobinmolekül entstanden.

Ferner wurde die Hämoglobin-Stammlösung auch einer Extinktionsmessung unterzogen. Die Extinktionsmessung wurde mit einer Hämoglobinlösung, deren Proteinanteil 0,02% betrug, durchgeführt. Als Meßgerät diente das BECKMANN Spectrophotometer Model 24. Die Messung zeigte das Spektrum von Oxyhämoglobin mit Extinktionsmaxima bei 415 nm, 542 nm und 577 nm [2] .

Damit war nachgewiesen, daß keine Denaturierung im Bereich der prosthetischen Gruppe und an dieser selbst eingetreten war.

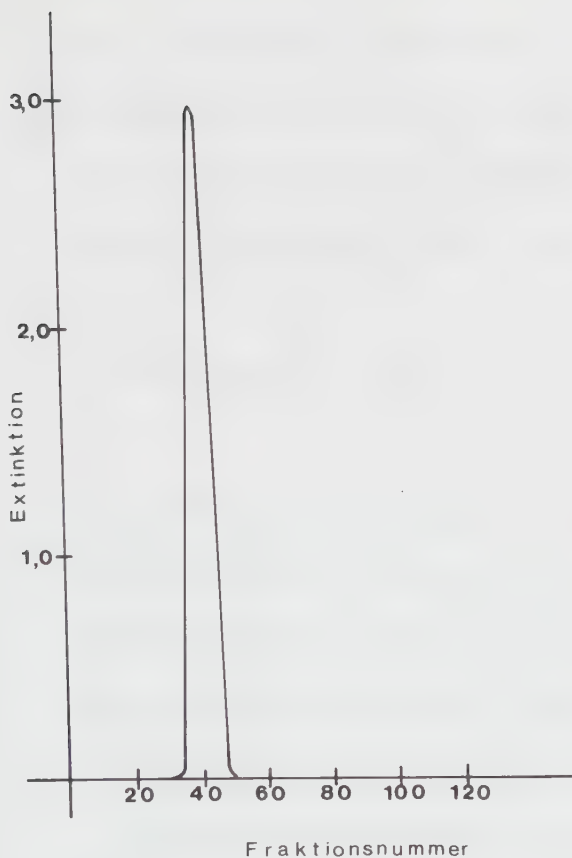


Abbildung 2.3 : Gelchromatogramm der Hämoglobinlösung.

Extinktion des Eluats in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen (Fraktionsnummer). Die Extinktion wurde bei 280 nm gemessen. SEPHADEX-G-75-Säule; Elution mit 0,1 molalen Phosphatpuffer; pH 7,4; Temperatur 4°C.

Bei der Herstellung der Hämoglobin-Stammlösung geht ein Teil des Oxy-Hämoglobins in Methämoglobin über. Nach Untersuchungen von R. MÜLLER [25] kann dieser Anteil auf 8% geschätzt werden, während durch Gefrieren, Auftauen und Rückverdünnen bis zu 30% Methämoglobin entstehen können (siehe dazu auch Abschnitt 2.5).

2.3.4 Herstellung einer Hämoglobinlösung mit Salzzugabe

Die Hämoglobin-Stammlösung wurde bei der Herstellung zweimal durch den Ionenaustauscher geschickt und enthält folglich keine Salzionen mehr. Zur Herstellung einer Hämoglobinlösung mit Salzen mußte daher Salz wieder zugegeben werden. Zu etwa 5 ml der Hämoglobinlösung, die genau ausgewogen waren, wurde 1 ml einer Kochsalzlösung gegeben, deren Salzgehalt so eingestellt war, daß eine Lösung entstand, die Hämoglobin in einer 0,9%-igen Kochsalzlösung enthielt.

2.4 Behandlung der Lösungen mit Kohlendioxyd-Gas

Um Oxy-Hämoglobin in Deoxy-Hämoglobin umzuwandeln wurden die verschiedenen Lösungen in Kontakt mit Kohlendioxyd-Gas gebracht. Dies geschah in einer gasdichten Kammer. Durch einen Schlauch am Boden der Kammer wurde Kohlendioxyd-Gas eingeleitet, die in der Kammer befindliche Luft konnte aus einer Öffnung an der Decke der Kammer entweichen. Nach 15 Minuten wurde die Kammer gasdicht verschlossen, und für etwa eine Stunde wurde Kohlendioxyd-Gas durch die zu behandelnde Lösung geleitet. Nach dieser Zeit wurden die Proben zur kalorimetrischen Messung entnommen und in einer Kammer unter ständigem Kohlendioxyd-Gasstrom luftdicht in Aluminiumkapseln eingeschlossen.

2.5 Spektrophotometrische Messungen

Zur Kontrolle wurde eine Hämoglobinlösung, deren Proteinanteil etwa 0,02% betrug, nach der in Abschnitt 2.4 beschriebenen Methode mit Kohlendioxyd-Gas behandelt. Vor und nach der Behandlung wurden Proben zur Extinktionsmessung entnommen. Als Meßgerät diente das BECKMANN Spectrophotometer Model 24. Die Extinktionskurve vor der Behandlung zeigte das Spektrum von Oxy-Hämoglobin (Abbildung 2.4), die Kurve nach der Behandlung das von Deoxy-Hämoglobin (Abbildung 2.5). Zur ungefähren quantitativen Abschätzung der Anteile der einzelnen Komponenten wurde eine Methode verwandt, wie sie von C.W. van ASSENDE [2] beschrieben wurde.

Diese Methode beruht auf der Tatsache, daß die gesamte Extinktion einer Lösung bei einer gegebenen Wellenlänge (E) gleich ist der Summe der Einzelextinktionen der Komponenten bei der gleichen Wellenlänge (Gleichung 5).

$$(5) \quad E_{\lambda} = E_1^{\lambda} + E_2^{\lambda} + \dots + E_n^{\lambda}$$

mit

$$(6) \quad E = \epsilon \cdot c \cdot l$$

ϵ = millimolaler Extinktionskoeffizient

c = Konzentration der Komponente

l = Küvettendicke

ergibt sich Gleichung 7.

$$(7) \quad E_{\lambda} = \epsilon_1^{\lambda} \cdot c_1 \cdot l + \epsilon_2^{\lambda} \cdot c_2 \cdot l + \dots + \epsilon_n^{\lambda} \cdot c_n \cdot l$$

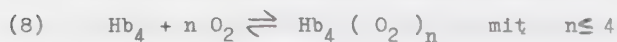
Falls die millimolalen Extinktionskoeffizienten der einzelnen Komponenten bekannt sind, und Extinktionsmessungen bei n verschiedenen Wellenlängen ausgeführt werden, kann man n Gleichungen vom Typ (7) erhalten, aus denen c_1 bis c_n berechnet werden können.

Es wurde davon ausgegangen, daß bei dieser Untersuchung stets ein drei Komponentensystem vorlag, bestehend aus Oxy-Hämoglobin, Deoxy-Hämoglobin und Methämoglobin. Die millimolalen Extinktionskoeffizienten wurden der Veröffentlichung von O.W. van ASSENDELFT [2] entnommen. Die gesamte Extinktion der Lösung wurde bei drei verschiedenen Wellenlängen gemessen, bei denen sich die millimolalen Extinktionskoeffizienten für die drei Komponenten signifikant unterschieden. Es wurde daher ein Gleichungssystem mit drei Gleichungen vom Typ (7) angesetzt, aus denen die Konzentrationen der drei Komponenten bestimmt werden konnte.

Vor der Behandlung ergab sich, daß 70% des Hämoglobins als Oxy-Hämoglobin, 15% als Deoxy-Hämoglobin und 15% als Methämoglobin vorlag. Nach der Behandlung mit Kohlendioxyd-Gas zeigte sich, daß nunmehr nur noch 20% des Hämoglobins

als Oxy-Hämoglobin und 60% als Deoxy-Hämoglobin vorlag. Der Anteil des Methämoglobin betrug 20%. Eine Probe wurde mit Kohlendioxyd-Gas behandelt, jedoch nicht luftdicht verschlossen. Die photometrische Messung unter Luftzutritt ergab folgende Werte: 55% Oxy-Hämoglobin, 15% Deoxy-Hämoglobin und 30% Methämoglobin. Die für Methämoglobin gemessenen Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den von R. MÜLLER [25] nach einer Methode von W. PILZ [30] gemessenen Werten.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß durch die Behandlung mit Kohlendioxyd-Gas das Gleichgewicht zwischen Oxy-Hämoglobin und Deoxy-Hämoglobin (siehe 8) reversibel zur Seite des Deoxy-Hämoglobins verschoben wird.



Mit der Behandlung ist auch eine Zunahme des Anteils an Methämoglobin verbunden, die jedoch im Vergleich zur Zunahme des Anteils an Deoxy-Hämoglobin nicht ins Gewicht fällt.

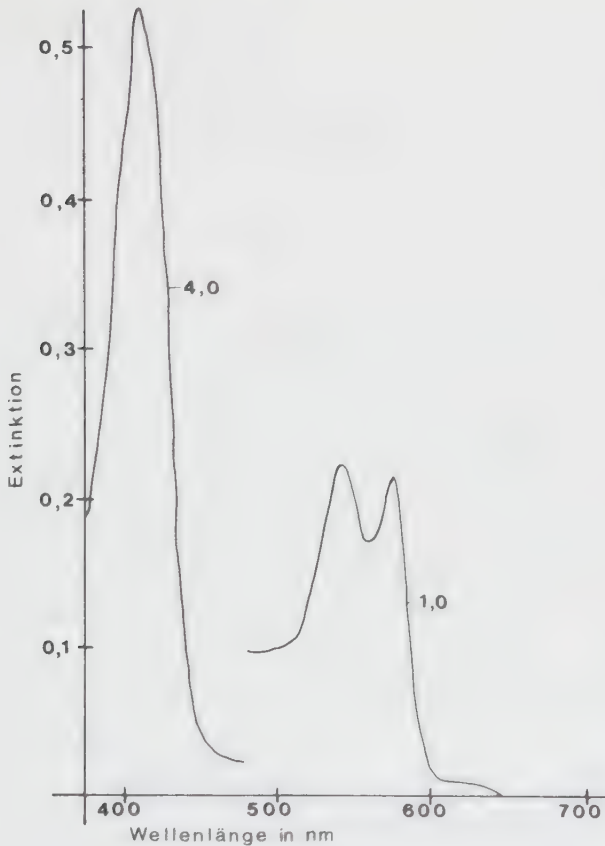


Abbildung 2.4 : Extinktionsspektrum einer Hämoglobinlösung im sichtbaren Bereich in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ in nm; das Spektrum wurde bei zwei unterschiedlichen Verstärkungen aufgenommen, die Zahl bei den Kurven gibt den Faktor an, mit dem die Ordinatenwerte multipliziert werden müssen. Etwa 70 % des Hämoglobins liegen als Oxy-Hämoglobin vor.

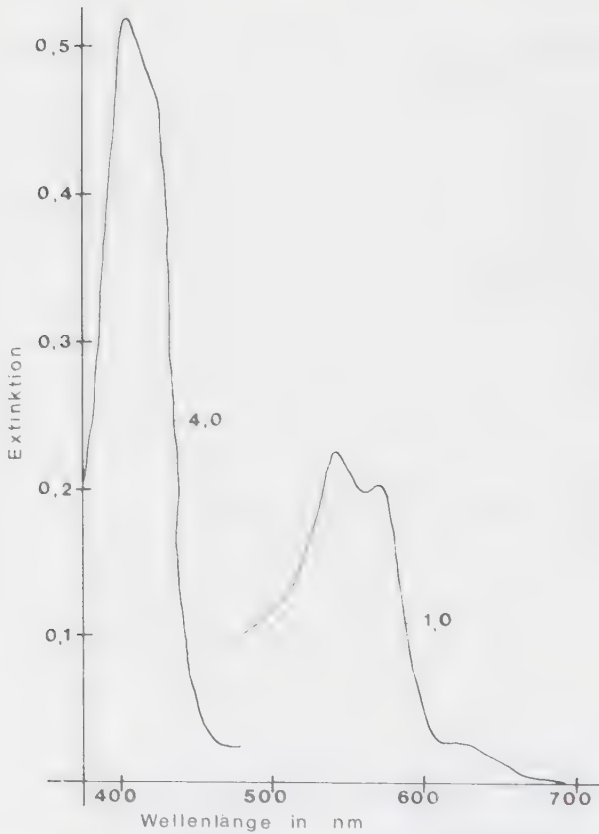


Abbildung 2.5 : Extinktionsspektrum einer Hämoglobinlösung im sichtbaren Bereich in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ in nm; das Spektrum wurde bei zwei unterschiedlichen Verstärkungen aufgenommen, die Zahl bei den Kurven gibt den Faktor an, mit dem die Ordinatenwerte multipliziert werden müssen.

Etwa 60 % des Hämoglobins liegen als Deoxy-Hämoglobin vor.

3 Meßergebnisse

Mit dem DSC-2 Kalorimeter wurden die Denaturierungsenthalpien und -temperaturen der Proben bestimmt.

3.1 Erläuterungen zur Darstellung der Meßergebnisse

Die Darstellung der Meßergebnisse erfolgte in der Reihenfolge des Vorgehens bei der Untersuchung. Zuerst wurden die Beobachtungen an einer luftdicht abgeschlossenen Erythrozytensuspension nachvollzogen (Abschnitt 3.2). Dann wurden die Ergebnisse dem Oxy- und Deoxyzustand des Hämoglobins zugeordnet (Abschnitt 3.3). Die Untersuchungen wurden auf Erythrozytenhämolysate (Abschnitt 3.4) und auf Hämoglobinlösungen mit und ohne Salzzugabe (Abschnitte 3.5 und 3.6) ausgedehnt.

Als Peak 1 wurde jeweils der Peak bezeichnet, der bei der niederen Temperatur auftritt, als Peak 2 der Peak, der bei der höheren Temperatur auftritt.

Jeder Peak wurde durch zwei Temperaturangaben charakterisiert. Als $T_{\max}$ wurde die Temperatur bezeichnet, bei der eine Parallele zur Bezugslinie den Peak als Tangente schneidet. Als T_{tang} wurde

die Temperatur bezeichnet, die beim Schnittpunkt der Wendetangente der ansteigenden Kurve mit der Bezugslinie abzulesen ist. Temperaturangaben werden stets in Grad Celsius gemacht.

Soweit dies die Peakgröße zulies, wurden die Halbwertsbreiten der einzelnen Peaks bestimmt und in Grad Celsius angegeben. Die Konstruktion der Halbwertsbreiten ist ebenso wie die der Temperaturangaben aus Abbildung 3.2 ersichtlich.

Die durch Bestimmung der Trockenmasse bei jeder einzelnen Probe gewonnenen Massen wurden in Milligramm angegeben. Die Trockenmassen bei Erythrozyten und Erythrozytenhämolysaten beziehen sich nur auf deren Hämoglobianteil. Der Anteil der Fremdproteine und anderer Stoffe am Trockengewicht (etwa 5,4%) wurde abgezogen. Ebenso wurde bei den Versuchen mit salzhaltiger Hämoglobinlösung das Trockengewicht um die Salzmenge korrigiert, die beim Verdampfen ausfällt.

Die Flächen wurden mit Hilfe einer Rechenanlage bestimmt. Der Anteil eines jeden einzelnen Peaks an der Gesamtfläche der beiden Peaks wurde in Prozent angegeben.

Die spezifische Denaturierungsenthalpie Δh wurde nach dem in Abschnitt 2.1.5 dargestellten Verfahren aus der Gesamtfläche beider Peaks und der jeweiligen korrigierten Trockenmasse bestimmt. Die Angaben werden in Joule je Gramm gemacht.

In jeder Tabelle werden die Ergebnisse von fünf Messungen angegeben, ebenso wie deren Mittelwerte (M.W.) und Standardabweichungen (S.D.). In den beiden letzten Zeilen einer Tabelle werden Werte für Δh_1 und Δh_2 angegeben. Sie geben die rechnerisch ermittelten Schätzwerte der spezifischen Denaturierungsenthalpien für den Oxy-Zustand (Δh_1) und den Deoxy-Zustand (Δh_2) an. Dabei wurde deutlich, daß in den Tabellen 3.8 und 3.10 jeweils ein Meßwert vorhanden war, der sich deutlich von den anderen unterschied. Um den Fehler zu reduzieren, wurden diese Werte nur in Klammern angegeben und bei der Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung nicht berücksichtigt. Das iterative Rechenverfahren zur Ermittlung der Werte für Δh_1 und Δh_2 wird im Anhang näher beschrieben.

Der Wassergehalt der Proben betrug bei den einzelnen Messungen zwischen 65% und 85% der Gesamtmasse.

3.2 Ergebnisse der Messungen von Erythrozyten- suspensionen vor und nach Lagerung unter Luftabschluß

In den ersten Versuchen wurden die Beobachtungen, die den Ausgangspunkt für diese Arbeit bildeten nachvollzogen. Dazu wurden 10 ml frisch entnommenes menschliches Citratblut eines gesunden Blutspenders der Blutbank Erlangen wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben aufbereitet. Von der Erythrozytensuspension wurden 15 Proben luftdicht in Aluminiumkapseln eingeschlossen. Fünf Proben wurden unmittelbar nach dem Einschließen im Kalorimeter gemessen. Die restlichen zehn Proben wurden bei Zimmertemperatur (23°C) gelagert. Nach 20 Stunden wurden drei Proben, nach 44 Stunden wurden zwei Proben und nach 68 Stunden wurden nochmals fünf Proben gemessen.

Die Messungen nach 20 und nach 44 Stunden zeigten die gleichen Ergebnisse wie die Messungen unmittelbar nach dem Einschließen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind daher nicht im Einzelnen dargestellt. Bei allen diesen Messungen trat ein breiter erster Peak auf mit einem Maximum bei etwa 85°C und ein kaum erkennbarer Peak mit einem Maximum bei 95°C . Nach 68 Stunden zeigten vier Messungen nur noch einen steilen Peak mit einem

Maximum bei 95°C . Bei der ersten Messung konnte sowohl ein breiter Peak bei 86°C als auch ein größerer steiler Peak bei 96°C beobachtet werden.

Die Messergebnisse sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 dargestellt.

Abbildung 3.1 zeigt eine Messung unmittelbar nach dem Einschließen.

Abbildung 3.2 zeigt eine Messung mit einem zweigipfeligen Verlauf.

Abbildung 3.3 zeigt eine Messung bei der nur noch der zweite Peak auftrat.

Tabelle 3.1 : Messergebnisse von fünf Messungen einer
Erythrozytensuspension unmittelbar nach dem
Einschließen in Aluminiumkapseln.

	1	2	3	4	5	M.W.	S.D.
Trockenmasse (mg)	2,93	2,27	4,16	1,89	4,67		
Peak 1, $T_{\max.}$ (°C)	84,9	85,5	85,4	85,0	85,8	85,3	0,4
Peak 1, $T_{\text{tang.}}$ (°C)	78,4	78,8	78,4	79,2	79,5	78,9	0,5
Peak 2, $T_{\max.}$ (°C)	94,5	95,3	95,3	95,5	96,4	95,4	0,7
Peak 2, $T_{\text{tang.}}$ (°C)	91,8	92,9	92,9	92,9	92,5	92,6	0,5
Hw.-Br. Peak 1 (°C)	7,0	7,7	7,0	7,7	7,0	7,3	0,4
Hw.-Br. Peak 2 (°C)	5,0	5,0	4,7	4,3	5,3	4,9	0,4
Fläche Peak 1 (%)	95,2	94,2	95,5	94,2	93,7		
Fläche Peak 2 (%)	4,8	5,8	4,5	5,8	6,3		
Δh (J · g ⁻¹)	14,6	15,1	15,2	14,5	13,9	14,7	0,5
Δh_1 (J · g ⁻¹)	14,2	14,6	14,8	14,0	13,4	14,2	0,5
Δh_2 (J · g ⁻¹)	32,5	33,4	33,9	32,0	30,6	32,5	1,3

Tabelle 3.2 : Messergebnisse von fünf Messungen einer Erythrozytensuspension 68 Stunden nach dem luftdichten Einschließen in Aluminiumkapseln.

	1	2	3	4	5	M.W.	S.D.
Trockenmasse (mg)	4,35	4,92	2,61	1,53	2,27		
Peak 1, $T_{\max}$. (°C)	84,4					84,4	
Peak 1, T_{tang} . (°C)	76,4					76,4	
Peak 2, $T_{\max}$. (°C)	95,9	95,8	95,7	95,2	94,9	95,5	0,4
Peak 2, T_{tang} . (°C)	89,9	89,9	89,9	90,4	88,9	89,8	0,5
Hw.-Br. Peak 1 (°C)	6,7					6,7	
Hw.-Br. Peak 2 (°C)	5,3	4,3	4,7	4,7	4,7	4,7	0,1
Fläche Peak 1 (%)	39,0	0	0	0	0		
Fläche Peak 2 (%)	61,0	100	100	100	100		
Δh (J · g ⁻¹)	24,7	30,9	31,1	30,2	35,8	30,5	3,9
Δh_1 (J · g ⁻¹)	16,2						
Δh_2 (J · g ⁻¹)	37,1	30,9	31,1	30,2	35,8	33,0	3,2

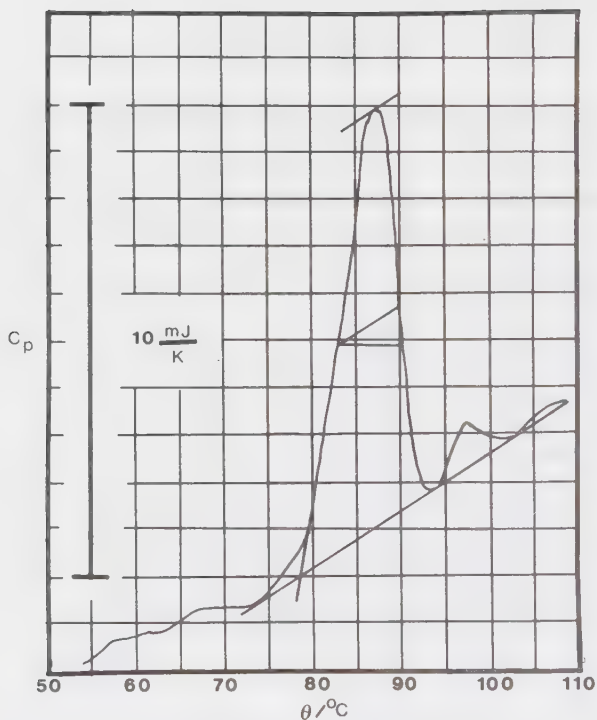


Abbildung 3.1 : Denaturierungsthermogramm einer Erythrozyten-
suspension unmittelbar nach dem Einschließen in eine
Aluminiumkapsel (fünfte Messung aus Tabelle 3.1).
Messung mit dem DSC-2 : Heizrate 10 Grad pro Minute,
Empfindlichkeit des Kalorimeters $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec}^{-1}$
($2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec}^{-1}$), Schreibervorschub 30 mm pro
Minute.

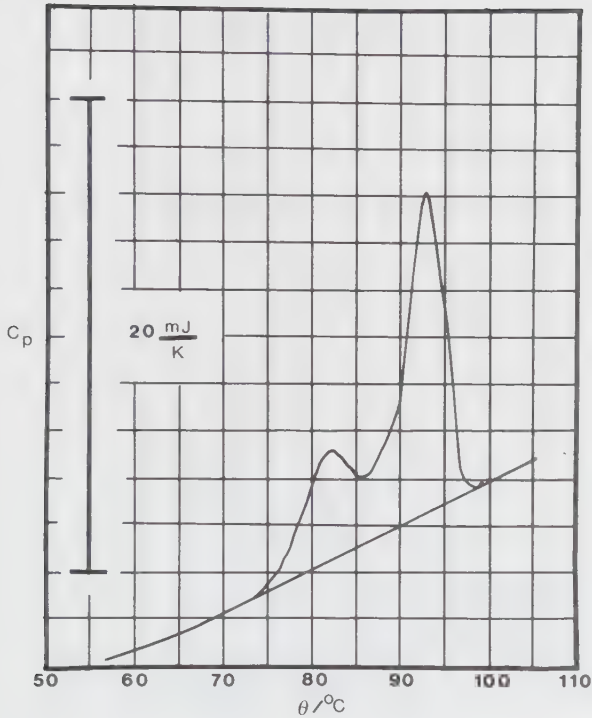


Abbildung 3.2 : Denaturierungsthermogramm einer Erythrozyten-
suspension 68 Stunden nach dem Einschließen in eine
Aluminiumkapsel (erste Messung aus Tabelle 3.2).
Messung mit dem DSC-2 : Heizrate 10 Grad pro Minute,
Empfindlichkeit des Kalorimeters $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec}^{-1}$
($2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec}^{-1}$), Schreibervorschub 30mm pro
Minute.

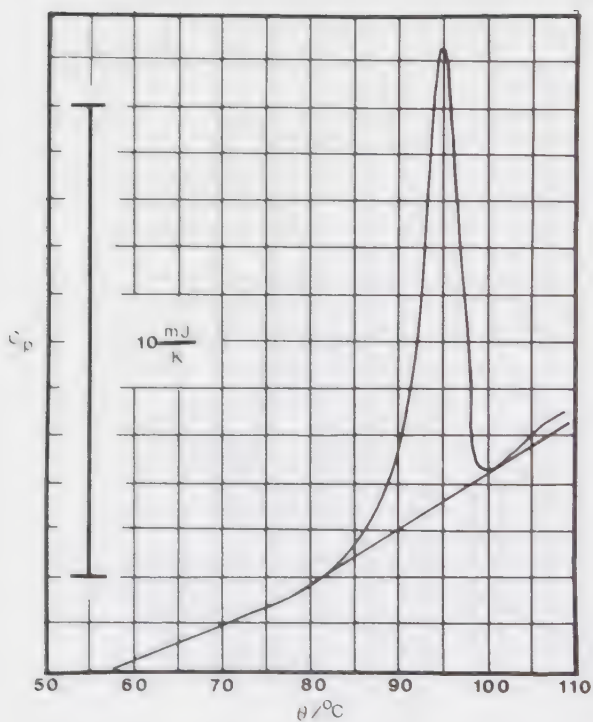


Abbildung 3.3 : Denaturierungsthermogramm einer Erythrozyten-
suspension 68 Stunden nach dem Einschließen in eine
Aluminiumkapsel (vierte Messung aus Tabelle 3.2).
Messung mit dem DSC-2 : Heizrate 10 Grad pro Minute,
Empfindlichkeit des Kalorimeters $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec}^{-1}$
($2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec}^{-1}$), Schreibervorschub 30 mm pro
Minute.

3.3 Ergebnisse der Messungen von Erythrozyten- suspensionen mit und ohne Behandlung mit CO₂-Gas

Im zweiten Versuchsteil wurde versucht die unterschiedlichen Denaturierungskurven dem Oxy- und Deoxyzustand des Hämoglobins zuzuordnen. Dazu wurden 10 ml frisch entnommenes Citratblut eines gesunden Blutspenders wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben aufbereitet. Die Erythrozytensuspension wurde etwa im Verhältnis 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Nach gutem Durchmischen wurde die Menge auf zwei Reagenzgläser verteilt. Das eine wurde in einer Kammer, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, mit CO₂-Gas behandelt. Während dieser Zeit blieb das zweite Reagenzglas unter Luftzutritt stehen. Aus jedem Reagenzglas wurden fünf Proben zur Messung im Kalorimeter entnommen.

Bei den Proben, die unter Luftzutritt stehen gelassen wurden, trat ein breiter erster Peak auf mit einem Maximum bei etwa 85°C und ein kaum erkennbarer Peak mit einem Maximum bei etwa 95°C. Bei den Proben, die mit CO₂-Gas behandelt worden waren, zeigte sich nur noch ein steiler Peak mit einem Maximum bei etwa 96°C.

Eine genaue Darstellung erfolgt in den Tabellen 3.3 und 3.4 und in den Abbildungen 3.4 und 3.5.

Tabelle 3.3 : Messergebnisse von fünf Messungen einer Erythrozytensuspension, die unter Luftzutritt in Aluminiumkapseln eingeschlossen wurde.

	1	2	3	4	5	M.W.	S.D.
Trockenmasse (mg)	1,80	1,38	1,82	1,49	1,68		
Peak 1, $T_{\max.}$ ($^{\circ}\text{C}$)	84,7	84,4	84,9	84,8	84,7	84,7	0,2
Peak 1, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	78,9	78,7	78,9	78,6	78,9	78,8	0,2
Peak 2, $T_{\max.}$ ($^{\circ}\text{C}$)	94,7	94,7	94,7	94,2	94,9	94,6	0,3
Peak 2, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	91,9	91,7	92,1	91,5	91,9	91,8	0,2
Hw.-Br. Peak 1 ($^{\circ}\text{C}$)	6,0	6,7	6,7	6,7	7,3	6,7	0,5
Hw.-Br. Peak 2 ($^{\circ}\text{C}$)	5,0	4,7	4,3	4,7	4,3	4,6	0,3
Fläche Peak 1 (%)	91,1	90,7	90,4	91,7	90,7		
Fläche Peak 2 (%)	8,9	9,3	9,6	8,2	9,3		
Δh ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	13,4	12,7	13,2	14,2	13,1	13,3	0,6
Δh_1 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	12,7	12,0	12,5	13,5	12,4	12,6	0,6
Δh_2 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	29,0	27,5	28,5	30,9	28,3	28,8	1,3

Tabelle 3.4 : Messergebnisse von fünf Messungen einer Erythrozytensuspension, die mit CO_2 -Gas behandelt wurde und unter einem CO_2 -Gasstrom in Aluminiumkapseln eingeschlossen wurde.

	1	2	3	4	5	M.W.	S.D.
Trockenmasse , (mg)	0,70	0,47	0,64	0,97	1,61		
Peak 1, $T_{\text{max.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)							
Peak 1, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)							
Peak 2, $T_{\text{max.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	96,1	95,9	95,7	96,5	96,4	96,1	0,3
Peak 2, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	90,7	89,9	90,3	90,4	90,9	90,4	0,4
Hw.-Br. Peak 1 ($^{\circ}\text{C}$)							
Hw.-Br. Peak 2 ($^{\circ}\text{C}$)	5,0	5,3	5,0	5,0	4,7	5,0	0,2
Fläche Peak 1 (%)	0	0	0	0	0		
Fläche Peak 2 (%)	100	100	100	100	100		
Δh ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	25,1	31,0	31,3	27,1	21,1	27,1	4,3
Δh_1 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)							
Δh_2 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)							

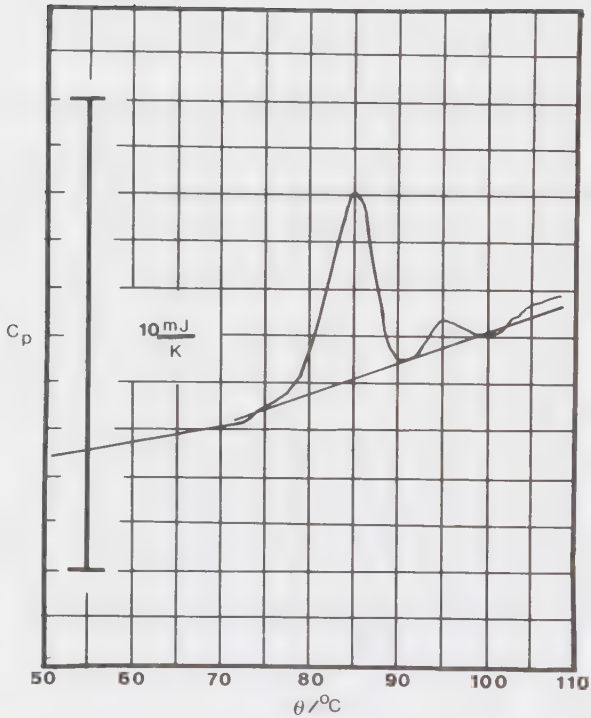


Abbildung 3.4 : Denaturierungsthermogramm einer Erythrozyten-
suspension im oxygenierten Zustand (erste Messung
aus Tabelle 3.3). Messung mit dem DSC-2 :
Heizrate 10 Grad pro Minute, Empfindlichkeit des
Kalorimeters $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec}^{-1}$ ($2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec}^{-1}$),
Schreibervorschub 30 mm pro Minute.

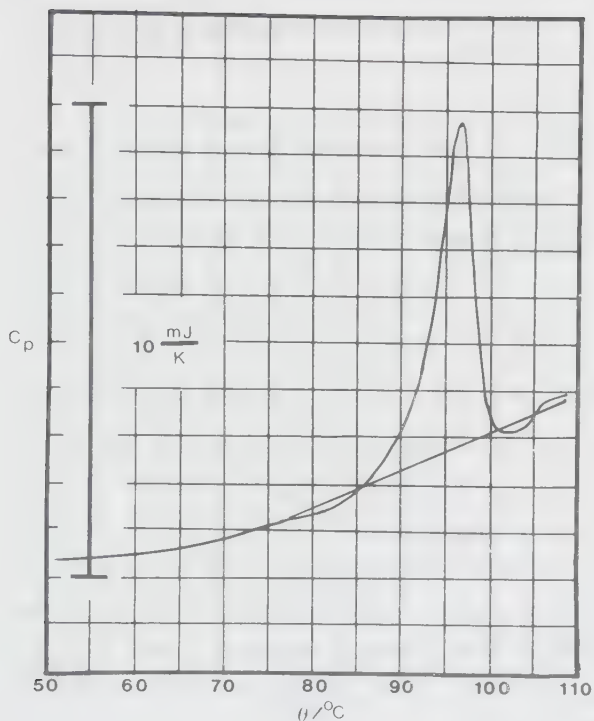


Abbildung 3.5 : Denaturierungsthermogramm einer Erythrozyten-
suspension im deoxygenierten Zustand (fünfte Messung
aus Tabelle 3.4). Messung mit dem DSC-2:
Heizrate 10 Grad pro Minute, Empfindlichkeit des
Kalorimeters $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec}^{-1}$ ($2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec}^{-1}$),
Schreibervorschub 30 mm pro Minute.

3.4 Ergebnisse der Messungen von Erythrozytenhämolysaten mit und ohne Behandlung mit CO_2 -Gas.

Die Versuche von Abschnitt 3.3 wurden nun auch mit einem Erythrozytenhämolysat durchgeführt. Zu 5 ml einer Erythrozytensuspension, die nach der in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Methode gewonnen wurde, wurden 4 ml demineralisiertes Wasser gegeben. Nach gutem Durchmischen wurde die Lösung für einige Minuten zentrifugiert. Es zeigte sich, daß Hämolyse eingetreten war. Nachdem die Menge erneut gut durchmischt war, wurde sie auf zwei Reagenzgläser aufgeteilt. Der Inhalt des einen Reagenzglases wurde in einer Kammer, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, mit CO_2 -Gas behandelt. Während dieser Zeit blieb das zweite Reagenzglas unter Luftzutritt stehen. Aus jedem Reagenzglas wurden fünf Proben zur Messung im Kalorimeter entnommen.

Bei den Messungen im Kalorimeter zeigten sich ähnliche Ergebnisse, wie bei den Messungen, die mit einer Erythrozytensuspension durchgeführt worden waren.

Eine genaue Darstellung erfolgt in den Tabellen 3.5 und 3.6 und in den Abbildungen 3.6 und 3.7.

Tabelle 3.5 : Messergebnisse von fünf Messungen eines Erythrozytenhämolysats, das unter Luftzutritt in Aluminiumkapseln eingeschlossen wurde.

	1	2	3	4	5	M.W.	S.D.
Trockenmasse (mg)	1,99	1,45	1,32	1,29	1,36		
Peak 1, $T_{\max.}$ ($^{\circ}\text{C}$)	86,9	86,8	85,7	86,4	85,3	86,2	0,7
Peak 1, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	80,3	79,4	79,7	80,7	78,8	79,8	0,7
Peak 2, $T_{\max.}$ ($^{\circ}\text{C}$)	95,3	94,9	94,7			95,0	0,3
Peak 2, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	93,2	92,9	93,3			93,1	0,2
Hw.-Br. Peak 1 ($^{\circ}\text{C}$)	6,7	6,7	6,7	7,3	6,3	6,7	0,4
Hw.-Br. Peak 2 ($^{\circ}\text{C}$)	5,0	4,3	4,0			4,4	0,5
Fläche Peak 1 (%)	95,3	93,7	95,9	100	100		
Fläche Peak 2 (%)	4,7	6,3	4,1	0	0		
Δh ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	15,0	17,1	16,0	14,1	16,1	15,7	1,1
Δh_1 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	14,6	16,5	15,6	14,1	16,1	15,4	1,0
Δh_2 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	33,4	37,7	35,7			35,6	2,2

Tabelle 3.6 : Messergebnisse von fünf Messungen eines Erythrozytenhämolysates, das mit CO₂-Gas behandelt wurde und unter einem CO₂-Gasstrom in Aluminiumkapseln eingeschlossen wurde.

	1	2	3	4	5	M.W.	S.D.
Trockenmasse (mg)	0,57	1,04	0,93	1,68	1,14		
Peak 1, T _{max.} (°C)	84,4	85,7	86,0	85,9	86,1	85,6	0,7
Peak 1, T _{tang.} (°C)	78,7	79,3	79,9	79,5	79,9	79,5	0,5
Peak 2, T _{max.} (°C)	95,4	93,9	94,9	93,9	93,7	94,4	0,7
Peak 2, T _{tang.} (°C)	88,3						
Hw.-Br. Peak 1 (°C)	6,0	6,3	7,3	8,3	7,3	7,0	0,9
Hw.-Br. Peak 2 (°C)	5,7	6,3	6,7	6,7	6,7	6,4	1,2
Fläche Peak 1 (%)	24,6	65,1	58,5	76,4	68,2		
Fläche Peak 2 (%)	75,4	34,9	41,5	23,6	31,8		
Δh (J · g ⁻¹)	42,5	24,8	28,9	15,4	24,3	27,2	9,9
Δh ₁ (J · g ⁻¹)	24,5	19,9	22,2	13,4	20,0	20,0	4,1
Δh ₂ (J · g ⁻¹)	55,9	45,6	50,6	30,5	45,6	45,6	9,5

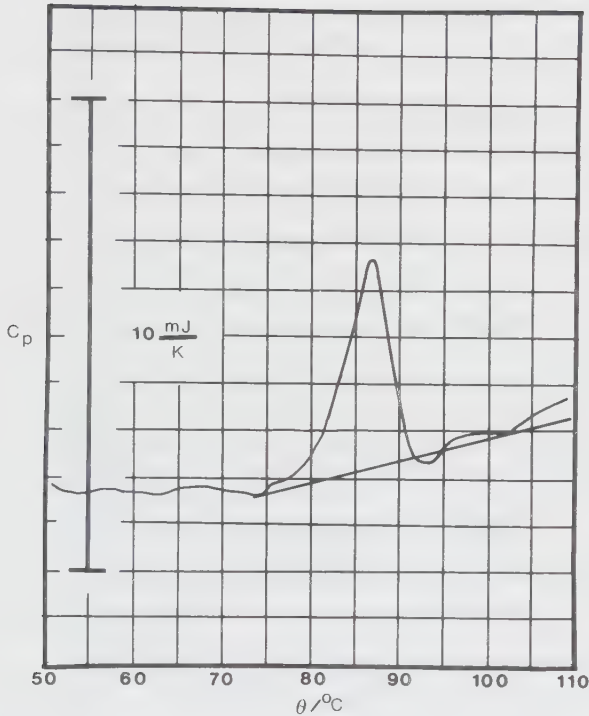


Abbildung 3.6 : Denaturierungsthermogramm eines Erythrozyten-hämolysats im oxygenierten Zustand (erste Messung aus Tabelle 3.5). Messung mit dem DSC-2: Heizrate 10 Grad pro Minute, Empfindlichkeit des Kalorimeters $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec}^{-1}$ ($2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec}^{-1}$), Schreibervorschub 30 mm pro Minute.

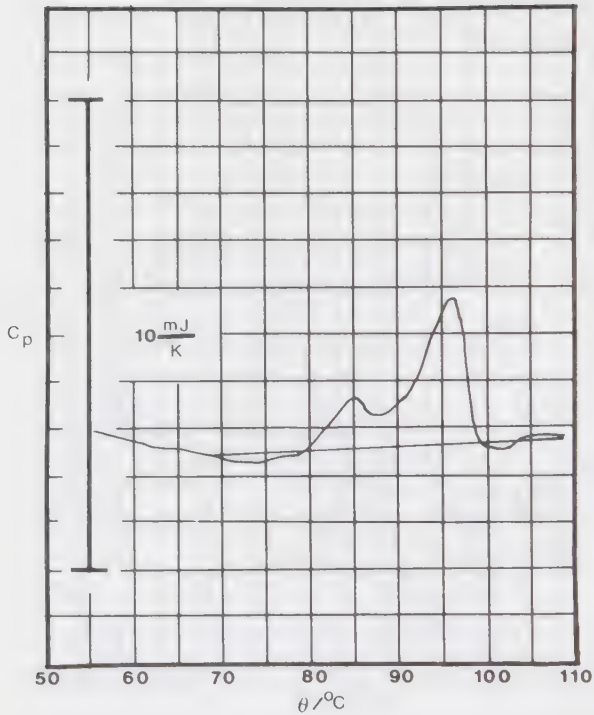


Abbildung 3.7 : Denaturierungsthermogramm eines Erythrozyten-hämolysats im deoxygenierten Zustand (erste Messung aus Tabelle 3.6). Messung mit dem DSC-2: Heizrate 10 Grad pro Minute, Empfindlichkeit des Kalorimeters $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec}^{-1}$ ($2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec}^{-1}$), Schreibervorschub 30 mm pro Minute.

3.5 Ergebnisse der Messungen von Hämoglobinlösungen mit und ohne Behandlung mit CO₂-Gas

Für diese Versuche wurde eine Hämoglobinlösung verwendet, die nach der in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Methode aus menschlichem Vollblut präpariert worden war. Am Vorabend der Versuche wurden 5 ml der Lösung zum Auftauen bei +4°C in den Kühlschrank gelegt. Die Lösung wurde vor dem Versuchsbeginn noch mit 1 ml destilliertem Wasser verdünnt. Die Menge wurde auf zwei Reagenzgläser verteilt. Der Inhalt des einen Reagenzglases wurde in einer Kammer, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, mit CO₂-Gas behandelt. Während dieser Zeit blieb das zweite Reagenzglas unter Luftzutritt stehen. Aus jedem Reagenzglas wurden fünf Proben zur Messung im Kalorimeter entnommen.

Bei den Proben, die unter Luftzutritt stehen gelassen worden waren, trat ein breiter erster Peak auf, mit einem Maximum bei etwa 85°C. Bei drei Messungen trat auch ein kleiner, kaum erkennbarer Peak auf mit einem Maximum bei etwa 95°C. Bei den Proben, die mit CO₂-Gas behandelt worden waren, zeigte sich nur noch ein kleiner erster Peak, dafür jedoch ein großer, steiler zweiter Peak.

Eine genaue Darstellung erfolgt in den Tabellen 3.7 und 3.8 und in den Abbildungen 3.8 und 3.9.

Tabelle 3.7 : Messergebnisse von fünf Messungen einer Hämoglobin-
lösung, die unter Luftzutritt in Aluminiumkapseln ein-
geschlossen wurde.

	1	2	3	4	5	M.W.	S.D.
Trockenmasse (mg)	1,16	1,36	1,58	2,02	1,40		
Peak 1, $T_{\max.}$ ($^{\circ}\text{C}$)	85,9	84,9	85,9	85,1	85,4	85,4	0,5
Peak 1, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	73,7	74,5	74,1	73,9	74,3	74,1	0,3
Peak 2, $T_{\max.}$ ($^{\circ}\text{C}$)			94,7	94,7	94,5	94,6	0,1
Peak 2, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)			91,3	91,3	91,7	91,4	0,2
Hw.-Br. Peak 1 ($^{\circ}\text{C}$)	11,0	11,3	10	10	10,3	10,5	0,5
Hw.-Br. Peak 2 ($^{\circ}\text{C}$)			6,7	7,0	6,4	6,7	0,3
Fläche Peak 1 (%)	100	100	91,9	90,8	93,3		
Fläche Peak 2 (%)	0	0	8,1	9,2	6,7		
Δh ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	14,7	14,4	15,8	14,5	14,8	14,8	0,6
Δh_1 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	14,7	14,4	15,1	13,7	14,2	14,4	0,5
Δh_2 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)			34,5	31,4	32,6	32,8	1,6

Tabelle 3.8 : Messergebnisse von fünf Messungen einer Hämoglobinlösung, die mit CO_2 -Gas behandelt wurde und unter einem CO_2 -Gasstrom in Aluminiumkapseln eingeschlossen wurden.

	1	2	3	4	5	M.W.	S.D.
Trockenmasse (mg)	1,24	0,58	1,72	1,16	1,46		
Peak 1, $T_{\text{max.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	83,7	83,9	83,9	83,9	83,7	83,8	0,1
Peak 1, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	76,4	76,7	75,9	76,1	75,4	76,1	0,5
Peak 2, $T_{\text{max.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	92,1	92,1	93,4	93,3	92,9	92,8	0,6
Peak 2, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	84,9	84,7	85,9	84,9	84,9	85,1	0,5
Hw.-Br. Peak 1 ($^{\circ}\text{C}$)	10,0	9,3	10,0	10,7	10,3	10,1	0,5
Hw.-Br. Peak 2 ($^{\circ}\text{C}$)	7,3	7,0	6,7	6,7	7,3	7,0	0,3
Fläche Peak 1 (%)	39,0	35,8	31,6	42,9	40,7		
Fläche Peak 2 (%)	61,0	64,2	68,4	57,1	59,3		
Δh ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	12,4	17,8	23,7	23,2	25,7	20,6	5,4
Δh_1 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	(8,1)	11,4	14,6	15,8	17,1	14,7 (13,4)	2,4 (3,6)
Δh_2 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	(18,6)	26,0	33,3	36,0	39,1	33,6 (30,6)	5,6 (8,3)

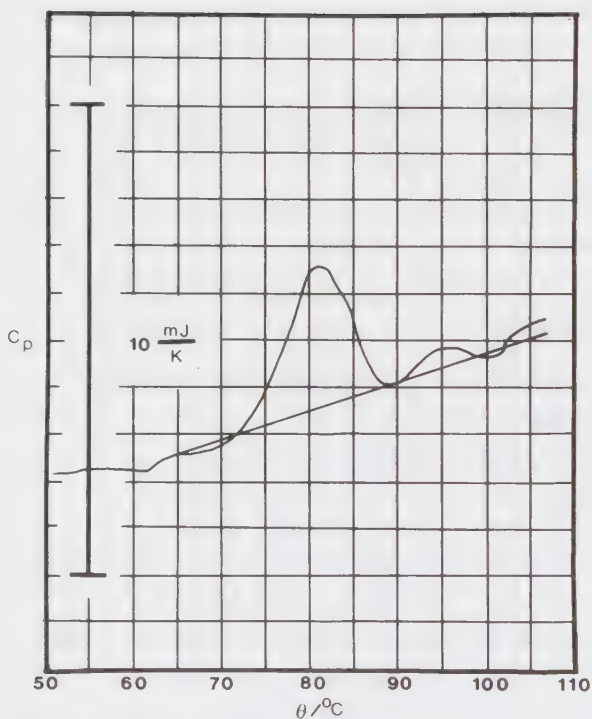


Abbildung 3.8 : Denaturierungsthermogramm einer Hämoglobin-
 lösung im oxygenierten Zustand (vierte Messung aus
 Tabelle 3.7). Messung mit dem DSC-2:
 Heizrate 10 Grad pro Minute, Empfindlichkeit des
 Kalorimeters $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec}^{-1}$ ($2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec}^{-1}$),
 Schreibervorschub 30 mm pro Minute.

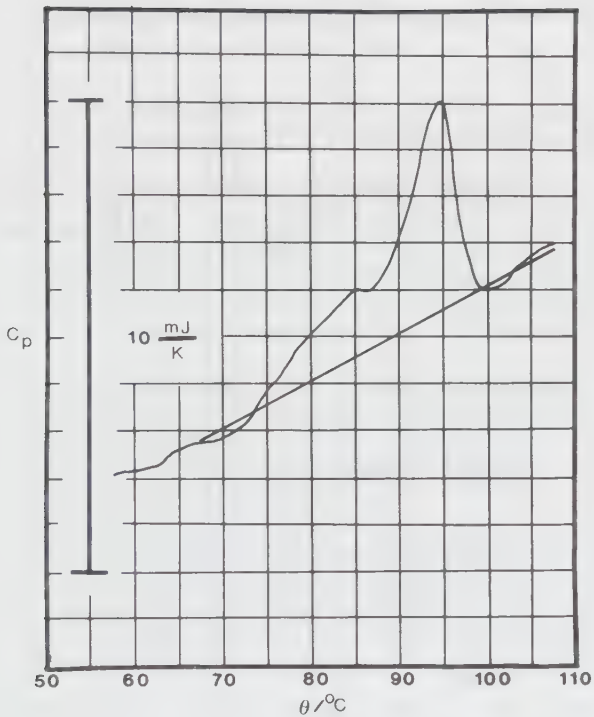


Abbildung 3.9 : Denaturierungsthermogramm einer Hämoglobin-
 lösung im deoxygenierten Zustand (dritte Messung
 aus Tabelle 3.8). Messung mit dem DSC-2:
 Heizrate 10 Grad pro Minute, Empfindlichkeit des
 Kalorimeters $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec}^{-1}$ ($2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec}^{-1}$),
 Schreibervorschub 30 mm pro Minute.

3.6 Ergebnisse der Messungen von Hämoglobin in Kochsalzlösung mit und ohne Behandlung mit CO₂-Gas

Die Versuche, die in Abschnitt 3.5 beschrieben wurden, wurden erneut durchgeführt, wobei diesmal das Hämoglobin in physiologischer Kochsalzlösung gelöst war. Die Herstellung einer Hämoglobinlösung mit Salzzugabe wurde in Abschnitt 2.3.4 beschrieben.

Bei der Versuchsdurchführung ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie bei den Versuchen, die mit Hämoglobinlösung ohne Salzzugabe gemacht wurden.

Eine genaue Darstellung erfolgt in den Tabellen 3.9 und 3.10 und in den Abbildungen 3.10 und 3.11.

Tabelle 3.9 : Messergebnisse von fünf Messungen einer Hämoglobin-
lösung mit Kochsalzzugabe, die unter Luftzutritt in
Aluminiumkapseln eingeschlossen wurde.

	1	2	3	4	5	M.W.	S.D.
Trockenmasse (mg)	3,40	1,65	2,62	2,13	2,62		
Peak 1, $T_{\max.}$ ($^{\circ}\text{C}$)	83,9	83,9	84,4	84,1	84,1	84,1	0,2
Peak 1, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	74,1	74,7	75,1	74,9	74,7	74,7	0,4
Peak 2, $T_{\max.}$ ($^{\circ}\text{C}$)	94,3	94,4	95,9	94,9	94,7	94,8	0,6
Peak 2, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	90,9	91,1	91,7	91,1	91,9	91,3	0,4
Hw.-Br. Peak 1 ($^{\circ}\text{C}$)	8,7	8,7	9,3	8,7	10,0	9,1	0,6
Hw.-Br. Peak 2 ($^{\circ}\text{C}$)	6,0	5,7	6,0	5,7	6,0	5,9	0,2
Fläche Peak 1 (%)	91,1	93,3	91,5	90,1	93,6		
Fläche Peak 2 (%)	8,9	6,7	8,5	8,9	6,4		
Δh ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	14,9	13,7	13,8	14,5	14,1	14,2	0,5
Δh_1 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	14,2	13,2	13,1	13,7	13,6	13,6	0,4
Δh_2 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	32,5	30,2	29,9	31,3	31,1	31,0	1,0

Tabelle 3.10 : Messergebnisse von fünf Messungen einer Hämoglobin-
lösung mit Kochsalzzugabe, die mit CO_2 -Gas behandelt wurde
und unter einem CO_2 -Gasstrom in Aluminiumkapseln ein-
geschlossen wurden.

	1	2	3	4	5	M.W.	S.D.
Trockenmasse (mg)	2,85	2,46	1,78	3,34	1,65		
Peak 1, $T_{\text{max.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	81,9	80,5	80,3	81,7	80,9	81,1	0,7
Peak 1, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	72,7	72,5	71,9	72,9	73,3	72,7	0,5
Peak 2, $T_{\text{max.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	95,7	94,9	94,3	95,9	93,9	94,9	0,9
Peak 2, $T_{\text{tang.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	88,3	88,1	87,7	88,4	87,5	88,0	0,4
Hw.-Br. Peak 1 ($^{\circ}\text{C}$)	10,0	9,7	10,0	10,7	10,3	10,1	0,5
Hw.-Br. Peak 2 ($^{\circ}\text{C}$)	6,0	5,7	5,7	6,0	5,7	5,8	0,2
Fläche Peak 1 (%)	31,3	29,2	32,6	31,5	26,3		
Fläche Peak 2 (%)	68,7	70,8	67,4	68,5	73,7		
Δh ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	24,2	21,3	36,1	21,5	21,9	25,0	6,3
Δh_1 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	14,8	12,8	(22,4)	13,2	12,8	13,4 (15,2)	1,0 (4,1)
Δh_2 ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	33,9	29,3	(51,2)	30,2	29,3	30,7 (34,8)	2,2 (9,4)

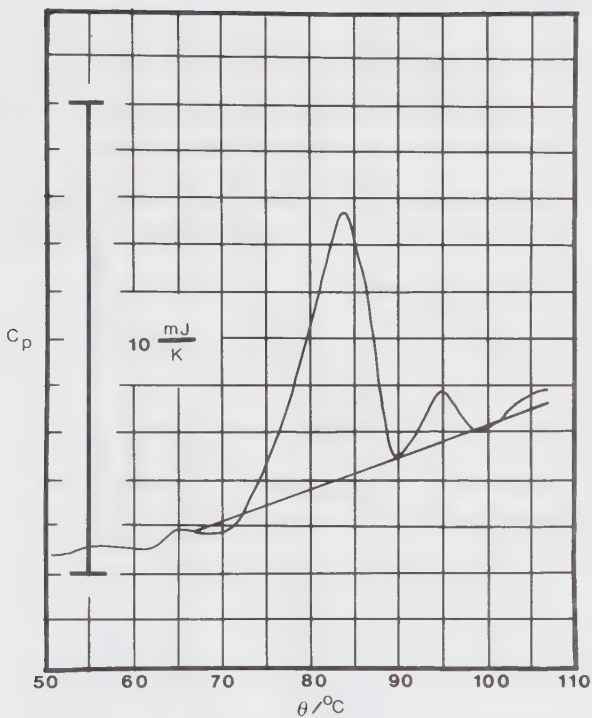


Abbildung 3.10 : Denaturierungsthermogramm einer Hämoglobinlösung mit Kochsalzzugabe im oxygenierten Zustand (erste Messung aus Tabelle 3.9). Messung mit dem DSC-2: Heizrate 10 Grad pro Minute, Empfindlichkeit des Kalorimeters $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec}^{-1}$ ($2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec}^{-1}$), Schreibervorschub 30 mm pro Minute.

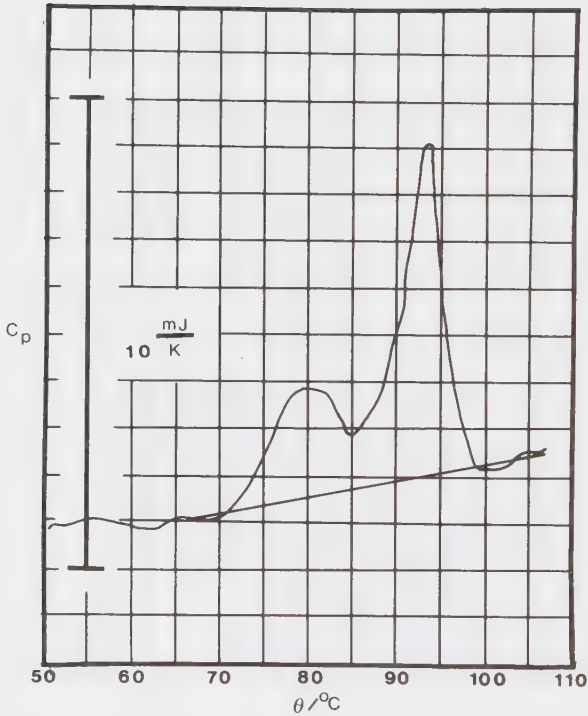


Abbildung 3.11 : Denaturierungsthermogramm einer Hämoglobin-
lösung mit Kochsalzzugabe im deoxygenierten Zustand
(dritte Messung aus Tabelle 3.10). Messung mit dem DSC-2:
Heizrate 10 Grad pro Minute, Empfindlichkeit des
Kalorimeters $0,5 \text{ mcal} \cdot \text{sec}^{-1}$ ($2,09 \text{ mJ} \cdot \text{sec}^{-1}$),
Schreibervorschub 30 mm pro Minute.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die im folgenden dargestellte Tabelle enthält die Mittelwerte der jeweiligen Messungen. Wenn mehr als zwei Messwerte für die Ermittlung des Mittelwertes zur Verfügung standen, so wurde in Klammern auch die Standardabweichung angegeben.

Versuch laut Tabelle	Δh_1 (J · g ⁻¹)	Δh_2 (J · g ⁻¹)	T _{tang.} ^{Peak 1} (°C)	T _{tang.} ^{Peak 2} (°C)
3.1	14,2 (0,5)	32,5 (1,3)	78,9 (0,5)	92,6 (0,5)
3.2	16,2	33,0 (3,2)	76,4	89,8 (0,5)
3.3	12,6 (0,6)	28,8 (1,3)	78,8 (0,2)	91,8 (0,2)
3.4		27,1 (4,3)		90,4 (0,4)
3.5	15,4 (1,0)	35,6 (2,2)	79,8 (0,7)	93,1 (0,2)
3.6	20,0 (4,1)	45,6 (9,5)	79,5 (0,5)	88,3
3.7	14,4 (0,5)	32,8 (1,6)	74,1 (0,3)	91,4 (0,2)
3.8	14,7 (2,4)	33,6 (5,6)	76,1 (0,5)	85,1 (0,5)
3.9	13,6 (0,4)	31,0 (1,0)	74,7 (0,4)	91,3 (0,4)
3.10	13,4 (1,0)	30,7 (2,2)	72,7 (0,5)	88,0 (0,4)

4 Diskussion

Anhand der gewonnenen Ergebnisse läßt sich sagen, daß durch die Behandlung von Hämoglobinlösungen und Erythrozytensuspensionen mit CO_2 -Gas die thermische Stabilität des Proteins Hämoglobin verändert wird. Wie durch spektrophotometrische Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, entsteht bei dieser Behandlung Deoxy-Hämoglobin. Es läßt sich daher vermuten, daß der Übergang von Oxy-Hämoglobin zu Deoxy-Hämoglobin mit einer Zunahme der thermischen Stabilität einhergeht. Diese Zunahme der thermischen Stabilität äußert sich in einem Anstieg, sowohl der Denaturierungstemperatur, als auch der Denaturierungsenthalpie. Die Denaturierungstemperatur steigt im Mittel um $13,5^\circ\text{C}$, die Denaturierungsenthalpie um $19,0 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$.

B. HÄGERDAL [14] beschreibt die Vorgänge beim Denaturieren von Myoglobin in einem Kalorimeter. Dabei zeigte sich, daß bei einem Wassergehalt der Proben von 30-80% die Temperaturwerte und die Enthalpiewerte bei der Denaturierung relativ konstant bleiben. Es kommt in diesem Bereich zu einer kompletten und irreversiblen Denaturierung. In diesem Bereich wurde für Myoglobin eine

Denaturierungstemperatur von 78°C und eine Denaturierungsenthalpie von 5 Kalorien je Gramm (20,9 Joule je Gramm) gemessen. Diese Werte zeigen eine gute Vergleichbarkeit mit den in dieser Untersuchung gemessenen Werten für Oxy-Hämoglobin.

Inter- und intramolekulare Interaktionen können Ursachen sein für eine Änderung der thermischen Stabilität von Proteinen. So veröffentlichte P.R. AZARI [3] bereits 1958 eine Untersuchung, in der nachgewiesen wurde, daß Conalbumin und Transferrin, wenn sie Eisenionen gebunden haben, gegen enzymatische Proteolyse und thermische Denaturierung stabiler sind. Diese Beobachtung wurde 1973 von J.W. DONOVAN [11] mit Hilfe eines registrierenden Differential-Kalorimeters bestätigt. Er fand, daß die Bindung von zwei Eisenatomen an Conalbumin die Denaturierungstemperatur um 21 Grad erhöht, und daß auch eine Erhöhung der Denaturierungsenthalpie auftrat.

Aber auch der umgekehrte Effekt, nämlich die Destabilisierung eines Proteins ist bekannt. So hat Alkohol einen destabilisierenden Effekt auf Aplysia-Myoglobin. 5% Äthanol senken die Denaturierungstemperatur von 63°C auf 56°C . [9] .

Auch die Bindung größerer Moleküle an Proteine kann eine Änderung der Thermostabilität verursachen. So beobachtete J.W. DONOVAN [16] eine Erhöhung der thermischen Stabilität durch die Bindung zweier Proteine. Die größere Thermostabilität des Komplexes Trypsin mit einem Inhibitor zeigt sich im Kalorimeter nur im Anstieg der Denaturierungstemperatur, während die Denaturierungsenthalpie die Summe der Einzelkomponenten betrug.

Eine Zunahme der Thermostabilität beobachtete J.W. DONOVAN [36] auch wenn Avidin Biotin bindet. Die Denaturierungstemperatur stieg von 85°C auf 132°C und die Denaturierungsenthalpie von 300 Kcal · mol⁻¹ auf 1000 Kcal · mol⁻¹. Dieser Anstieg der Denaturierungsenthalpie um mehr als das dreifache kann durch die Bindungsenthalpie der Bindung Avidin-Biotin nicht allein erklärt werden.

Durch die Bindung verschiedenster kleiner oder großer Moleküle ist es also möglich die thermische Stabilität eines Proteins zu erhöhen oder zu erniedrigen. Eine Erhöhung der thermischen Stabilität eines Proteins kann sich in einer Erhöhung der Denaturierungsenthalpie und der Denaturierungstemperatur oder nur in einer Erhöhung der Denaturierungstemperatur äußern. Die in dieser Untersuchung gefundene höhere Thermostabilität

von Deoxy-Hämoglobin im Vergleich zu Oxy-Hämoglobin äußert sich sowohl in einer Erhöhung der Denaturierungstemperatur, als auch in einer Erhöhung der Denaturierungsenthalpie.

Eine Erklärung mag in der Möglichkeit bestehen, daß das Molekül 2,3-Diphosphoglycerat das Deoxy-Hämoglobin stabilisiert.

Nennenswerte Konzentrationen an 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) werden nur in den Erythrozyten gefunden. Dort ist es in etwa äquimolarer Konzentration zum Hämoglobin enthalten. Durch das Enzym Diphosphoglyceratmutase entsteht aus 1,3-DPG, einem Zwischenprodukt des Emden-Meyerhof-Weges, 2,3-DPG. Dieses 2,3-DPG wird bevorzugt an das Deoxy-Hämoglobin gebunden und zwar im Verhältnis ein Mol 2,3-DPG pro Mol Tetramer Deoxy-Hämoglobin. Durch die bevorzugte Affinität des 2,3-DPG zum Deoxy-Hämoglobin wird die Bildung von Deoxy-Hämoglobin aus Oxy-Hämoglobin gefördert. Somit wird die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins gemindert. [5,12] .

2,3-DPG hat keinen Einfluß auf die Tertiärstruktur des Hämoglobins, es mag jedoch die Quartärstruktur stabilisieren [1] . Es ist daher denkbar, daß das 2,3-DPG die größere Thermostabilität des Deoxy-Hämoglobins verursacht.

Die Zunahme der Denaturierungsenthalpie läßt sich nicht alleine durch die Bindungsenthalpie des 2,3-DPG an Deoxy-Hämoglobin erklären. Auch die Differenz der spezifischen Wärmekapazitäten Δc_p zwischen nativen und denaturierten Protein ist nicht groß genug, um die in dieser Untersuchung gefundene Enthalpiezunahme von $19,0 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ hinreichend zu erklären. Eine rechnerische Abschätzung der hier aufgeführten Erklärungsversuche für die Enthalpiezunahme befindet sich im Anhang zu dieser Arbeit.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß Deoxy-Hämoglobin eine größere thermische Stabilität besitzt als Oxy-Hämoglobin. Diese Erhöhung der thermischen Stabilität äußert sich in einer Erhöhung der Denaturierungstemperatur von 76,8 Grad Celsius auf 90,2 Grad Celsius und in einer Erhöhung der Denaturierungsenthalpie von 14,9 Joule je Gramm auf 33,1 Joule je Gramm.

6 Anhang

6.1 Erklärungsmöglichkeiten für die gemessene Differenz der Denaturierungsenthalpien von Oxy-Hämoglobin und Deoxy-Hämoglobin

In dieser Arbeit wurde für Deoxy-Hämoglobin eine um etwa 19 Joule je Gramm größere Denaturierungsenthalpie gemessen, als für Oxy-Hämoglobin. Im Folgenden soll eine quantitative Abschätzung von drei möglichen Erklärungsversuchen gegeben werden.

- Lösung der Bindung zwischen Deoxy-Hämoglobin und 2,3-Diphosphoglyzerat (2,3-DPG)
- Zerfall des Tetramers Hämoglobin in seine Untereinheiten
- Unterschiede in der Wärmekapazität zwischen nativem und denaturiertem Hämoglobin.

Es ist wahrscheinlich, daß bei der thermischen Denaturierung die Bindung zwischen Deoxy-Hämoglobin und 2,3-DPG gelöst wird. Geht man von dieser Annahme aus, so muß man von dem gemessenen Enthalpiewert die Enthalpie der Bindung zwischen 2,3-DPG und Deoxy-Hämoglobin abziehen, um die wahre Denaturierungsenthalpie zu erhalten. Nach Angaben in der Literatur [29] beträgt diese Bindungsenthalpie 7 Kilokalorien je Mol.

Dies bedeutet, daß von der gemessenen Denaturierungsenthalpie 0,43 Joule je Gramm für diesen Effekt abgezogen werden können. Da 2,3-DPG bevorzugt an Deoxy-Hämoglobin bindet, mag dies eine Ursache sein für die größere Denaturierungsenthalpie des Deoxy-Hämoglobins.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, daß das Tetramer Hämoglobin beim Erhitzen in seine Untereinheiten zerfällt. Dieser Zerfall in die Monomere kann einen Peak im Thermogramm zur Folge haben. Tritt dieser Effekt erst bei einer höheren Temperatur auf, so könnte dies erklären, daß der zweite Peak größer ist als der erste. Diese Erklärungsmöglichkeit ist jedoch unwahrscheinlich, da jede Messung bis zu einer Temperatur von 380 Kelvin durchgeführt worden ist. Der Zerfall in die Untereinheiten hätte also bei jeder Messung nachweisbar sein müssen. Tatsächlich trat jedoch nur bei den Lösungen, die Deoxy-Hämoglobin enthielten ein großer zweiter Peak auf.

Es muß jedoch noch berücksichtigt werden, daß natives und denaturiertes Hämoglobin eine unterschiedliche Wärmekapazität aufweisen. R. MÜLLER [25] hat für denaturiertes Hämoglobin eine um $0,33 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ größere spezifische Wärmekapazität als für natives Hämoglobin gemessen. Tritt nun der Übergang vom nativen zum denaturierten Hämoglobin bei einer um 14 Grad

höheren Temperatur ein, so muß folglich bei der höheren Temperatur auch eine höhere Denaturierungsenthalpie gemessen werden. Dieser Effekt würde eine Enthalpiezunahme um 4,6 Joule je Gramm erklären. Diese Enthalpie entspricht der in Abbildung 6.1 schraffiert gezeichneten Fläche.

Durch die hier aufgeführten Erklärungsmöglichkeiten läßt sich also ein Unterschied in der Denaturierungsenthalpie von Deoxy-Hämoglobin und Oxy-Hämoglobin von 0,43 Joule je Gramm und von 4,6 Joule je Gramm rechnerisch erklären. Damit wird jedoch keine hinreichende Erklärung für die bei den Messungen gefundene Enthalpiezunahme von 19 Joule je Gramm gegeben.

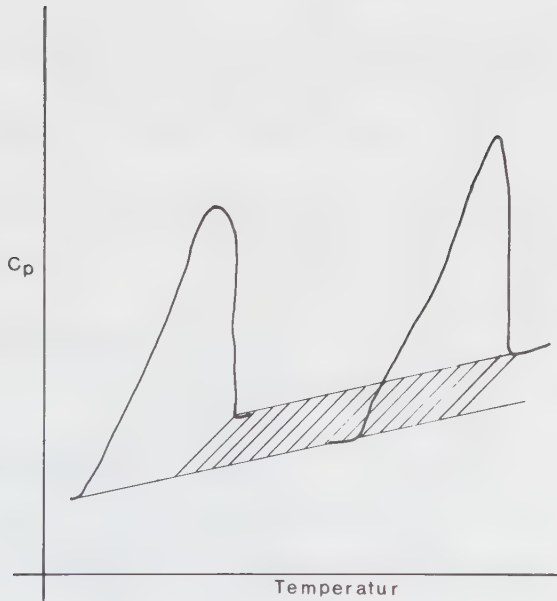


Abbildung 6.1 : Denaturierungsthermogramm zur
Darstellung der unterschiedlichen spezifischen
Wärmekapazitäten von nativem und denaturiertem
Hämoglobin.

6.2 Berechnung der spezifischen Denaturierungsenthalpie für Hämoglobin im Oxy- und Deoxy-Zustand

Im allgemeinen liegt bei den gemessenen Proben eine Mischung aus Oxy- und Deoxy-Hämoglobin vor. Der Methämoglobinanteil soll bei der folgenden Berechnung außer Acht bleiben.

Die spezifische Denaturierungsenthalpie der Mischung setzt sich wie folgt zusammen:

$$(9) \quad \frac{\Delta H}{m} = \Delta h = w_1 \cdot \Delta h_1 + w_2 \cdot \Delta h_2$$

ΔH :	gesamte gemessene Enthalpie- änderung
m :	Probenmasse
Δh :	spezifische Denaturierungs- enthalpie der Mischung
w_1, w_2 :	die Massenbrüche von Oxy- Hämoglobin (1), bzw. Deoxy- Hämoglobin (2)
$\Delta h_1, \Delta h_2$:	die spezifischen Denaturierungs- enthalpien für Oxy-Hb (1), bzw. Deoxy-Hb (2)

Es gilt:

$$(10) \quad w_1 = \frac{m_1}{m_1 + m_2} ; \quad w_2 = \frac{m_2}{m_1 + m_2} ; \quad w_1 + w_2 = 1$$

Der Kürze wegen wird definiert:

$$(11) \quad h_1 = \Delta h_1 ; \quad h_2 = \Delta h_2 ; \quad h = \Delta h$$

Aus Gleichung (9) ergibt sich:

$$(12) \quad h = w_1 h_1 + w_2 h_2$$

In Gleichung (12) ist nur h ein direkter Meßwert. Aus den Flächenverhältnissen oder Teilflächen der Meßkurven kann weder auf h_1 noch auf w_1 geschlossen werden, da diese Unbekannten über das Produkt verbunden sind.

Die Gleichung (12) ist also nicht linear in den Unbekannten w_1 , w_2 , h_1 , h_2 . Daraus folgt, daß keine übliche Ausgleichsrechnung Aussagen über die Unbekannten treffen kann. Sollen die Unbekannten trotzdem errechnet werden, so muß ein iteratives Verfahren gewählt werden.

Zunächst wird versucht die Zahl der Parameter zu reduzieren. In Gleichung (12) sind es noch vier Parameter. Die Nebenbedingung (10) reduziert sie auf drei.

Da die Peakflächen für Oxy- und Deoxy-Hämoglobin über der Temperatur auch ohne Gaussanalyse gut zu trennen sind, stehen außer dem Meßwert h noch die relativen Werte :

$$(13) \quad y_1 = \frac{w_1 h_1}{h} \quad \text{und} \quad y_2 = \frac{w_2 h_2}{h}$$

als Meßwerte zur Verfügung.

Wegen der Nebenbedingung:

$$(14) \quad y_1 + y_2 = 1$$

wird der Parametersatz aber nur um einen auf zwei reduziert.

Es kann günstig sein, wenn man zum Beispiel h_1 und h_2 zu einem Quotienten zusammenfaßt:

$$(15) \quad z_1 = \frac{h_1}{h_2} ; \quad z_2 = \frac{h_2}{h_1} ; \quad z_2 = z_1^{-1} .$$

Der Parametersatz wird dadurch nicht reduziert, da h_1 und h_2 nur durch z_1 und z_2 ersetzt werden.

Aus den aufgeführten Gleichungen lässt sich nun folgende mathematische Ausführung herleiten:

$$(12) \quad h = w_1 h_1 + w_2 h_2$$

$$\text{mit (10) (15)} \quad h = w_1 h_1 + (1-w_1) z_2 h_1$$

$$\text{mit (13)} \quad h = y_1 h + z_2 h_1 - w_1 z_2 h_1$$

$$\begin{aligned} \text{mit (13)} \quad h &= y_1 h + z_2 h_1 - y_1 z_2 h \\ h &= y_1 h (1 - z_2) + z_2 h_1 \end{aligned}$$

$$\text{Daraus folgt: } h_1 = h [1 - y_1 (1 - z_2)] z_2^{-1}$$

$$\text{mit (15)} \quad h_1 = h [z_1 + y_1 (1 - z_1)] \quad \text{Gleichung (16)}$$

Da die Gleichung (12) in w_1, w_2 und h_1, h_2 symmetrisch ist, muß aus Gleichung (16) folgen :

$$(17) \quad h_2 = h [z_2 + y_2 (1 - z_2)]$$

Mit (16) und (17) stehen Einzelgleichungen mit jeweils zwei Unbekannten h_1, z_1 , beziehungsweise h_2, z_2 zur Verfügung.

Die Werte für z_1 und z_2 werden nun im iterativen Verfahren nach der Wahl eines "vernünftigen" Startwertes so lange variiert, bis die Standardabweichungen für die Werte h_1 und h_2 in den Tabellen 3.1 bis 3.10 minimiert sind.

Dabei müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- Es existiert keine dritte Komponente, wie zum Beispiel Methämoglobin, oder diese Komponente stört das Ergebnis nicht.
- Alle Messungen sind in der Hinsicht vergleichbar, daß h_1 und h_2 immer konstant sind.

Beide Voraussetzungen sind offensichtlich nur

näherungsweise erfüllt. Daher dürfen an die Iteration nicht allzu große Forderungen gestellt werden. Trotzdem bietet die Auftrennung von h in h_1 und h_2 eine wesentliche Verbesserung in der Datenanalyse, da dadurch Messungen verglichen werden können, die ganz unterschiedliche w_1 - beziehungsweise w_2 -Werte haben.

Die zweite Voraussetzung wird durch die Wahl des Parameters z_1 dahingehend gemildert, daß nur das Verhältnis von h_1 und h_2 konstant sein soll.

Die Iteration wird nun wie folgt durchgeführt:

Der Startparameter $z_1(0)$ ergibt sich aus den Tabellen 3.1 und 3.2. Bei diesen Versuchen lagen Lösungen vor, die beinahe nur Oxy-, beziehungsweise Deoxy-Hämoglobin enthielten. Es sei daher:

$$(18) \quad z_1(0) = \frac{14}{32} .$$

Die Berechnung der Werte h_1 und h_2 in Tabelle 3.1 bestätigt $z_1(0)$. Ein zweiter Iterationsschritt mit einem Wert $z_1(1)$ ist daher nicht mehr sinnvoll.

Mit dem Wert $z_1(0) = \frac{14}{32}$ werden nun in den Tabellen 3.1 bis 3.10 die Werte h_1 und h_2 errechnet.

In Abschnitt 3.7 wird eine zusammenfassende Darstellung der so ermittelten Werte für alle durchgeführten Versuche gegeben.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Arone A.: X-ray Diffraction Study of Binding of 2,3-Diphosphoglycerate to Human Deoxyhaemoglobin. *Nature* 237 (1972) 146-149.
- 2 van Assendelft O.W.: Spectrophotometry of haemoglobin derivatives. Dissertation Universität Groningen (1970).
- 3 Azari P.R.,
 Feeney R.E.: Resistance of Water Complexes of Conalbumin to Proteolysis and to thermal Denaturation. *J. Biol. Chem.* 232 (1958) 293-302
- 4 Bateman J.B.: A note on the heat production of blood. *J. Physiol.* 71 proc.p. 18 (1931).
- 5 Benesch R.,
 Benesch R.E.: Intracellular Organic Phosphates as Regulators of Oxygen Release by Haemoglobin. *Nature*, 221 (1969) 618-622.
- 6 Berger R.L.: Human Isoionic Hemoglobin: Preparation and Kinetic Properties. *Univ. San Diego La Jolla, Anal. Let.*, 6 (2), (1973) 125-138.

- 14 Hägerdal B.,
Martens H.: Influence of Water Content on the Stability of Myoglobin to Heat Treatment. *Journal of Food Science*, 41 (1976) 933-937.
- 15 Hinson J.A.,
McMeekin T.L.: A Rapid Method for Preparation of Crystallin Human Haemoglobin and the Separation of Crystallin Haemoglobin A in Quantity. *Univ. South Carolina, Columbia*, march 6 (1969); *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* Vol 35, No.1 (1969). Heat Stabilization Produced by Protein-Protein Association. *J. Biol. Chem.*, 250 (1975) 1966-1971.
- 17 Keidel W.D. *Kurzgefaßtes Lehrbuch der Physiologie*. 4.Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1975.
- 18 Krakauer T.,
Krakauer H.: Antigenic Stimulation of Lymphocytes. I. Calorimetric Exploration of Metabolic Responses. *Cellular Immunology* 26 (1976) 242-253.
- 19 Lehninger A.L.: *Biochemie*. 2.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1977.

- 20 Levin K.: Heat Production by Leucocytes and Thrombocytes Measured with a Flow Microcalorimeter in normal Man and during Thyroid Dysfunction. Clin. Chim. Acta 32 (1971) 87-94.
- 21 Levin K.: Determination of Heat Production from Erythrocytes in Normal Man and in Anemic Patients with Flow Microcalorimetry. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 32 (1973) 55-65.
- 22 Menges G.: Der Aktivitätskoeffizient von KCl in hochkonzentrierten Hämoglobulinlösungen und in Erythrozyten. Dissertation, Univ. Erlangen-Nürnberg (1973).
- 23 Monti M.,
Wadsö I.: Microcalorimetric Measurements of Heat Production in Human Erythrocytes. II. Hyperthyroid Patients before, during and after Treatment. Acta Med. Scand. 200 (1976) 301-308.
- 24 Monti M.,
Wadsö I.: Microcalorimetric Measurements of Heat Production in Human Erythrocytes. I. Normal Subjects and Anemic Patients. Scand. J. clin. Lab. Invest. 32 (1973) 47-54.

- 25 Müller R.: Die spezifische Wärmekapazität von Hämoglobin-Wasser-Mischungen in einem Temperaturbereich von 10°C bis 80°C . Dissertation, Univ. Erlangen-Nürnberg (1976).
- 26 Müller R.,
Hasl G.,
Pauly H.: Determination of the Specific Heat Capacity of Hemoglobin and Met-hemoglobin-Water Mixtures Using an Adiabatic Calorimeter. *Thermochimica Acta* 22 (1978) 339-345.
- 27 McNaughton J.L.,
Mortimer C.T.: Registrierende Differential Kalorimetrie. Bodenseewerk Perkin-Elmer & CO, GMBH Überlingen.
- 28 Perutz M.F.: Structure and Funktion of Haemoglobin. A Tentative Atomic Model of Horse Oxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 646-668.
- 29 Perutz M.F.; Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin. *Nature* 228 (1970) 726-739.
- 30 Pilz W.,
Johann I.,
Boo A.T.: Die Bestimmung von Methämoglobin im menschlichen Blut. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 2 (1973) 179-201.
- 31 Rauen H.M.: Biochemisches Handbuch, Teil II. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964.

- 32 Rigas D.A., Ultracentrifugal fractionation
Koler R.D.: of human erythrocytes on the
basis of cell age. J. Lab.
clin. Med. 58 (1961) 242-246
- 33 Schroeder G., In Perutz M.F. (siehe 28)
Braunitzer G.:
- 34 Spector W.S.: Handbook of biological data.
Saunders Comp. , Philadelphia
(1956).
- 35 Tretter N.: Der Aktivitätskoeffizient von
NaCl in hochkonzentrierten
Hämoglobinlösungen und in Erythro-
zyten. Dissertation, Univ.
Erlangen-Nürnberg (1975).
- 36 Donovan J.W., Increase in the Stability of Avidin
Ross K.D.: Produced by Binding of Biotin.
A Differential Scanning Calorimetric
Study of Denaturation by Heat.
Biochemistry 12 (1973) 512-517.

Herrn Prof. Dr. Dr. Pauly danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, die ich am Institut vorfand.

Auch Herrn Dr. Müller möchte ich für die vorbildliche Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Zu ihm konnte ich mit vielen Fragen kommen und sein Interesse an der Arbeit gab mir die Ausdauer, diese Arbeit fertigzustellen.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonderer Dank gebührt Frau Dr. Schüßler und ihren Mitarbeiterinnen, die mir mit vielen Ratschlägen bei der Durchführung der biochemischen Arbeiten halfen.

Nicht zuletzt möchte ich an dieser Stelle auch meiner Frau und meiner Mutter danken, die durch Ermunterungen und ihr Verständnis die Durchführung dieser Arbeit ermöglichten.

Lebenslauf

Ich, Klaus Schmid, wurde am 27.9.1958 als einziges Kind des Diplom-Ingenieurs Hubert Schmid und dessen Ehefrau Charlotte Schmid, geborene Niklas, in Nürnberg geboren.

Im Herbst 1964 kam ich in die Schule. Nach der Grundschule besuchte ich ab 1968 das Dürer-Gymnasium in Nürnberg. Dort erhielt ich 1977 das Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife.

Am 13.6.1976 verstarb mein Vater nach langer Krankheit. Mit Beginn des Wintersemesters 1977/78 konnte ich an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg mein Medizinstudium beginnen.

In Erlangen bestand ich am 28.8.1979 die ärztliche Vorprüfung, am 28.8.1980 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung und am 20.8.1982 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Im März 1982 heiratete ich meine Frau Jutta Schmid, geborene Saalfrank.

In Erlangen bestand ich am 12.10.1983 den schriftlichen Teil und am 9.11.1983 den mündlichen Teil des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung.

